

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
"FEDERICO II"



Dipartimento di Sanità Pubblica
Scuola di Dottorato in Morfologia Clinica e Patologica
XXVIII Ciclo
Coordinatore: Prof.ssa Stefania Montagnani

Tesi di dottorato di ricerca

**ALLESTIMENTO DI SCAFFOLD SINTETICI E BIOLOGICI PER
LA RIGENERAZIONE DEL MIOCARDIO**

RELATORE:

CANDIDATO:

Prof.ssa Clotilde Castaldo

Dott.ssa Valeria Barbato

ANNO ACCADEMICO 2014/2015

INDICE

Sommario	4
1. Introduzione	6
1.1. Cardiomiopatia ischemica	6
1.2. Terapia della cardiomiopatia ischemica	7
1.2.a Terapia farmacologica	7
1.2.b Terapia cellulare	7
1.3. Matrice extracellulare (ECM)	9
1.4. Microambiente miocardico.....	12
1.5. Bioingegneria tissutale	14
1.5.a Scaffold prodotti con polimeri sintetici	15
1.5.b Scaffold prodotti con polimeri naturali.....	16
1.5.c Scaffold biologici.....	17
2. Scopo dello studio.....	19
3. Materiali e metodi	21
3.1. Pazienti	21
3.2. Allestimento di scaffold	21
3.2.1. Scaffold sintetici	21
3.2.2. Scaffold biologici di matrice decellularizzata	22
a) Sezioni di matrice decellularizzata	22
b) Idrogeli matrice-fibrina.....	23
3.3. Caratterizzazione degli scaffold	24
3.3.1. Scaffold sintetici	24
3.3.2. Scaffold biologici.....	24
a) Analisi dell'efficacia della decellularizzazione	24
Estrazione e quantizzazione del DNA.....	24
Analisi istochimica	25
b) Analisi della composizione della matrice decellularizzata	25
Analisi quantitativa di Collagene e GAG	25
Estrazione proteica ed array per fattori di crescita	25
Analisi istochimica	26
3.4. Isolamento e coltura delle CPC	26
3.5. Realizzazione di scaffold tridimensionali cellularizzati.....	27
3.5.1. Scaffold sintetici	27

3.5.2. Scaffold biologici.....	27
3.6. Estrazione dell'RNA e analisi del differenziamento delle CPC sugli scaffold.....	28
3.6.1 Sintetici.....	28
3.6.2. Biologici	28
3.7. Analisi istologica degli idrogeli matrice-fibrina	29
3.8. Analisi statistica dei dati.....	29
4. Risultati.....	30
4.1. Scaffold sintetici.....	30
4.1.1. Caratterizzazione degli scaffold	30
4.1.2. Effetti sulle CPC.....	30
4.2 Scaffold biologici	31
4.2.1. Caratterizzazione degli scaffold	31
4.2.2. Effetti sulle CPC.....	32
5. Discussione	33
6. Iconografia	38
7. Bibliografia	50

Sommario

I progressi raggiunti nella conoscenza delle caratteristiche biologiche delle cellule staminali e la dimostrazione della presenza di cellule progenitrici nel tessuto cardiaco adulto hanno posto le basi per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche che mirano alla rigenerazione del miocardio.

In vivo, le cellule staminali sono accolte nella nicchia, un microambiente specializzato, in cui esse interagiscono con le cellule di supporto e con le componenti solubili e insolubili della matrice extracellulare (ECM), in grado di regolare la sopravvivenza, la proliferazione e il differenziamento cellulare. L'alterazione dell'omeostasi dell'ECM, associata al danno ischemico, rende le cellule progenitrici cardiache (CPC) incapaci di supportare la rigenerazione cardiaca nonostante la loro intensa attivazione e l'elevato potenziale miogenico. Nelle cardiomiopatie gravi il trattamento di elezione è il trapianto d'organo, il cui limite, però, risiede nella scarsa disponibilità dei donatori e nelle complicazioni legate alle reazioni immunologiche. Negli ultimi anni una promettente alternativa è rappresentata dalla bioingegneria, che mira alla rigenerazione tissutale mediante l'uso di scaffold tridimensionali ottenuti dalla combinazione di cellule staminali e materiali biomimetici.

Sulla base di tali considerazioni, lo scopo del presente studio è stato quello di sviluppare scaffold sintetici e biologici, capaci di riprodurre le funzioni biologiche e meccaniche dell'ECM cardiaca naturale. Tali scaffold potrebbero favorire la rigenerazione del tessuto miocardico danneggiato stimolando l'adesione, la proliferazione ed il differenziamento delle CPC, isolate da cuori umani adulti, espunti per insufficienza cardiaca allo stadio terminale.

Gli scaffold sintetici sono stati costruiti mediante tecniche di prototipazione rapida, a partire dal poliuretano termoplastico KBC2000, riproducendo proprietà fisiche e meccaniche paragonabili a quelle del miocardio umano, ed un'architettura capace di garantire un sufficiente apporto di nutrienti e ossigeno alle cellule. In particolare, sono stati utilizzati scaffold non funzionalizzati e scaffold funzionalizzati con la laminina-1, un'importante proteina bioattiva della matrice extracellulare cardiaca e con la gelatina, usata come controllo. Le CPC sono state piastrate sugli

scaffold, funzionalizzati e non, e dal confronto delle loro proprietà biologiche è emerso che la funzionalizzazione con la laminina ne induce il differenziamento verso la linea dei cardiomiociti.

Sebbene gli scaffold sintetici siano caratterizzati da proprietà meccaniche e fisiche tali da sostenere le funzioni cellulari, gli scaffold biologici rispondono meglio alle richieste metaboliche e biochimiche delle cellule. Per tale motivo, utilizzando diversi protocolli di decellularizzazione, precedentemente descritti e testati in vitro ed in vivo, sono stati allestiti scaffold biologici da sezioni di tessuto di miocardio umano, ottenuto da cuori espantati per insufficienza cardiaca post-ischemica.

I risultati ottenuti hanno permesso di identificare il protocollo migliore, sulla base della rapidità, semplicità e preservazione dell'architettura dei principali componenti dell'ECM, nonché dei glicosamminoglicani e dei fattori di crescita. Inoltre sono stati allestiti gel naturali ottenuti dalla combinazione dell'ECM cardiaca decellularizzata e solubilizzata con la fibrina, polimero naturale capace stimolare l'homing, la proliferazione ed il differenziamento cellulare.

Lo studio condotto evidenzia che il complesso sistema di interazioni cellule-ECM svolge un ruolo determinante nel guidare la rigenerazione cardiaca. La scelta del tipo di scaffold, naturale o biomimetico, così come delle componenti bioattive dell'ECM da utilizzare in associazione a quest'ultimo, è di fondamentale importanza per l'ottimizzazione del processo di riparo tissutale e di conseguenza di rigenerazione del miocardio infartuato.

1. Introduzione

1.1. Cardiomiopatia ischemica

Il miocardio è un organo il cui metabolismo è di tipo essenzialmente aerobico, basato su reazioni ossidative che necessitano di ossigeno e di nutrienti, indispensabili per l'attività elettrica e la capacità contrattile delle cellule miocardiche. Quando il flusso ematico coronarico diventa inadeguato a soddisfare tale richiesta, si verifica una condizione di sofferenza miocardica, ovvero un evento ischemico, più comunemente secondario ad un'ostruzione coronarica su base aterosclerotica (1). Alterazioni anatomiche tipiche dell'aterosclerosi ed alterazioni funzionali (vasocostrizione sia epicardica che del microcircolo e/o trombosi) determinano una serie di quadri clinici definiti globalmente come cardiomiopatia ischemica (2).

Le manifestazioni cliniche della cardiomiopatia ischemica sono fondamentalmente l'angina pectoris e l'infarto miocardico. L'angina pectoris è legata allo squilibrio transitorio tra domanda ed apporto metabolico al miocardio. L'ischemia è reversibile e non provoca danno anatomico permanente. L'infarto miocardico consegue ad un'ischemia miocardica protratta, che porta a danno cellulare irreversibile e necrosi miocardica, con formazione di una cicatrice fibrosa non contrattile e quindi discinesie cardiache che possono condurre a insufficienza cardiaca (3-5).

Secondo i dati raccolti dall'Organizzazione Mondiale della Sanità, in Italia le malattie cardiovascolari sono causa del 45-50% della mortalità globale (6), la cardiomiopatia ischemica è, a sua volta, responsabile del 31% dei decessi dovuti a malattie cardiovascolari (7).

Tra i fattori di rischio che predispongono alla cardiomiopatia ischemica si distinguono quelli modificabili, in quanto possono essere corretti cambiando stile di vita o con trattamento farmacologico di condizioni predisponenti quali ipertensione, diabete mellito e ipercolesterolemia. Sono, invece, fattori di rischio non modificabili la familiarità per cardiomiopatia ischemica, l'età e il sesso, con una maggiore incidenza nell'età avanzata e nei soggetti di sesso maschile, dal momento che gli estrogeni hanno effetto protettivo.

1.2. Terapia della cardiomiopatia ischemica

1.2.a Terapia farmacologica

La terapia farmacologica rappresenta il primo approccio alla cardiomiopatia ischemica e mira alla prevenzione dell'infarto del miocardio, nonché alla riduzione della sintomatologia anginosa e della gravità dell'ischemia. La terapia della cardiopatia ischemica prevede l'impiego di farmaci antiaggreganti piastrinici tra cui, l'acido acetil-salilico, la ticlopidina e il clopidogrel, con effetto antitrombotico, e di farmaci antianginosi, quali i nitroderivati che, in quanto vasodilatatori, migliorano il flusso coronarico e riducono il consumo miocardico di ossigeno. Tali farmaci, tuttavia, risultano spesso solo parzialmente efficaci (8). Il trattamento farmacologico della cardiomiopatia ischemica può prevedere, inoltre, l'utilizzo di calcio-antagonisti, vasodilatatori che riducono il flusso attraverso i canali transmembrana del calcio, beta-bloccanti, che proteggono dagli effetti catecolaminergici tossici attraverso la down-regulation dei recettori beta adrenergici. Alla terapia antischemica convenzionale possono essere associati farmaci finalizzati a migliorare la funzione del microcircolo, come i derivati xantinici (teofillina, bamifillina, aminofillina), ACE-inibitori, statine, ipolipemizzanti, imipramina e, nelle donne in menopausa, la terapia estrogenica (9).

Interventi di rivascolarizzazione coronarica invasivi rappresentano alternative alla terapia farmacologica: in casi di cardiomiopatie gravi l'intervento di by-pass e l'angioplastica si sono mostrati più vantaggiosi in termini di sopravvivenza rispetto alla terapia farmacologica. Tuttavia, il trattamento di elezione dell'insufficienza cardiaca grave conseguente a cardiomiopatia ischemica è il trapianto d'organo.

1.2.b Terapia cellulare

Il cuore umano adulto è un organo in grado di auto-rinnovarsi in quanto possiede una riserva di cellule primitive cardiache (CPCs) che possono essere individuate dall'espressione di marcatori di staminalità, quali c-kit, recettore tirosino-chinasico per lo stem cell factor (SCF) noto anche come CD117, MDR-1 (Multi Drug Resistance protein) e Sca-1 (Stem Cell Antigen) (10-14).

Tali cellule in vivo contribuiscono al turnover cellulare (15) e, attraverso il rilascio di fattori paracrini, modulano l'omeostasi cardiaca, la riparazione tissutale e le condizioni di invecchiamento dell'organo (16). E' stato dimostrato, sia in modelli animali (17) che nel cuore umano (18), che il numero delle cellule progenitrici aumenta nel cuore danneggiato rispetto al cuore sano. Esse, inoltre, conservano la capacità di differenziarsi anche quando isolate dal cuore sia murino che umano e, in vitro, sono in grado di dare origine a cardiomiociti, cellule muscolari lisce e cellule endoteliali (10).

L'esistenza di cellule indifferenziate cardiache insieme alle difficoltà terapeutiche della cardiomiopatia ischemica cronica terminale, legate essenzialmente a complicanze immunologiche (19) e alla scarsa disponibilità di donatori, ha dato inizio alla ricerca di un'alternativa terapeutica al trapianto d'organo. Inizialmente la terapia cellulare, attraverso l'impiego di diverse linee cellulari staminali, come i mioblasti scheletrici (20), le cellule progenitrici endoteliali circolanti (EPC) (21), le CPC (15), le cellule staminali derivate dal midollo osseo (BMSCs) (22), i cardiomiociti fetali (23), le cellule staminali embrionali (ESC) e le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs), si è rivelata promettente in modelli animali di cardiopatia ischemica, in quanto capace di rigenerare il miocardio. Le ESC, ottenute da cellule isolate dalla blastocisti e coltivate in vitro, rappresentano il tipo cellulare ideale in quanto presentano un'elevata capacità di differenziare in qualsiasi tipo cellulare (24), tuttavia l'impiego di tali cellule è complicato da problemi etici e dal rischio di formazione di teratomi (25). Un'alternativa interessante alle ESC sono le iPSCs, derivate da cellule adulte riprogrammate, tipicamente fibroblasti, e riportate ad uno stato pluripotente indifferenziato mediante l'inserimento di specifici geni (26). Dal momento che le cellule somatiche adulte vengono isolate dal paziente stesso non è necessaria una terapia immunosoppressiva, mentre persiste il rischio relativo alla tumorigenesi, poiché, una volta riprogrammate, si tratta di cellule pluripotenti (27). Tuttavia, studi in vivo hanno dimostrato che in seguito a somministrazione intramiocardica di cellule staminali in modelli animali di cardiopatia ischemica, la rigenerazione avviene solo in una ristretta regione del ventricolo, ai bordi della zona infartuata. Pertanto è possibile che la

rigenerazione del cuore sia limitata da fattori legati al microambiente in grado di inibire il differenziamento delle cellule progenitrici (28).

Dal momento che le CPCs risiedono in vivo in aree anatomiche protette caratterizzate da basso stress emodinamico (29), dette “nicchie” sono stati sviluppati nuovi approcci terapeutici volti a stimolare la rigenerazione tissutale sostenuta da cellule staminali endogene o esogene, modulandone il differenziamento (30) in risposta a stimoli specifici provenienti dal microambiente (31).

Attualmente, quindi, l’obiettivo della terapia con cellule staminali non è più ottenere semplicemente un differenziamento tessuto-specifico attraverso iniezione intramiocardica o transendocardica (32), o infusione endovenosa o intracoronarica (33), di cellule staminali, quanto piuttosto quello di ristabilire l’integrità tissutale ripristinando il microambiente e la componente cellulare, in modo da sostituire definitivamente il tessuto necrotico o cicatriziale con miocardio sano.

1.3. Matrice extracellulare (ECM)

Il microambiente e le diverse componenti che costituiscono l’ECM influenzano le caratteristiche biologiche dei tessuti e, di conseguenza, delle cellule staminali cardiache residenti. Pertanto è fondamentale considerare la composizione e le funzioni di tale matrice, prodotta in particolare da cellule del tessuto connettivo, tra cui i fibroblasti.

L’ECM fondamentalmente è costituita da acqua, proteine, glicoproteine e polisaccaridi. Essa assicura un supporto strutturale e meccanico per le cellule nonché biochimico e biomeccanico, indispensabile per la morfogenesi, il differenziamento e l’omeostasi cellulare (34). Rappresenta, inoltre, un’importante riserva di fattori di crescita e di molecole bioattive, di cui modula la sintesi e regola la biodisponibilità. La matrice è un complesso sistema di interazioni dinamiche tra le stesse componenti della matrice e la superficie delle cellule residenti che le hanno prodotte, collegate tra loro da recettori transmembrana (35, 36). I principali recettori transmembrana che mediano il collegamento tra le proteine dell’ECM e le cellule sono le integrine, costituiti da due subunità glicoproteiche α e β , che si assemblano tra loro formando differenti tipi di integrine (37). Tali

recettori, attraverso un meccanismo conosciuto come “inside-out signalling” sono coinvolti nella trasduzione del segnale, regolazione dell’espressione genica, proliferazione, differenziamento, migrazione e morte cellulare (38).

I principali componenti dell’ECM sono i glicosamminoglicani (GAG) e le proteine fibrose. Essi si organizzano in una struttura tridimensionale, che a sua volta può essere suddivisa in due importanti forme: la membrana basale, che separa l’epitelio dallo stroma circostante ed è costituita soprattutto da collagene IV, laminina ed eparansolfato, e la matrice interstiziale, che circonda le cellule fungendo da impalcatura strutturale per i tessuti ed è composta soprattutto da collagene I e fibronectina.

I GAG sono costituiti da unità ripetute di disaccaridi unite con legami covalenti a specifiche proteine (core protein) per formare i proteoglicani (PG) (39). La componente polisaccaridica forma nei tessuti una sostanza gelatinosa, altamente idratata, resistente alle forze di compressione, in cui sono immerse le proteine fibrose e i PG possono inoltre regolare le attività delle proteine secrete, proteggendole dalla degradazione proteolitica, modulare la segnalazione chimica tra le cellule, legando i fattori di crescita e aumentandone o inibendone l’attività di segnalazione (40), controllare migrazione e proliferazione cellulare (41) e differenziamento durante la guarigione delle ferite e la crescita tumorale (42).

Le proteine fibrose con funzioni strutturali, come collagene ed elastina (43), assicurano il supporto necessario alle cellule, mentre le proteine fibrose con funzioni adesive quali fibronectina (44), laminina (45), tenascina (46) e osteopontina (47) fungono da ligandi interagendo con i recettori presenti sulla superficie cellulare, favorendo l’interazione tra le cellule e l’ECM, e, quindi la trasduzione del segnale e la regolazione della trascrizione genica (48).

Il collagene è la proteina fibrosa non solubile più abbondante della matrice nell’organismo umano (49). Esso è presente nel tessuto connettivo di tutti gli organi ed in particolare nei tendini e nella pelle ed è prodotto da fibroblasti, cellule endoteliali e cellule epiteliali (50). Tale proteina offre una grande resistenza alle forze di tensione e ricopre, allo stesso tempo, un importante ruolo nei processi

di adesione e migrazione cellulare (51). Finora sono stati identificati circa 30 tipi di collagene, che possono essere suddivisi in collagene non-fibrillari (IV, VI, VII, VIII, IX, X, XII, XIII, XIV) e in collagene fibrillari (I, II, III, V e XI), con gli ultimi che costituiscono un'impalcatura strutturale dei tessuti (52).

L'elastina è una proteina strutturale presente nella maggior parte dei tessuti connettivi, ai quali garantisce elasticità e possibilità di deformarsi, quando sottoposti a tensioni meccaniche. Le fibre di elastina durano per tutta la vita dell'organo in cui sono depositate, infatti, nell'adulto, si ha formazione di nuove fibre di elastina soltanto in seguito ad un loro danneggiamento. Tale proteina è sintetizzata dai fibroblasti e dalle cellule muscolari lisce, in forma di tropoelastina, precursore solubile. Le molecole di tropoelastina, una volta secrete negli spazi intercellulari, subiscono un processo di aggregazione, trasformandosi in elastina, proteina altamente idrofoba ed insolubile. Le fibre di elastina rappresentano le strutture più lunghe dell'ECM, legate tra loro da legami covalenti e con una struttura simile a quella del collagene in quanto ricca di glicina e prolina (53).

La fibronectina è prodotta sotto forma di dimero solubile e può presentarsi in forma plasmatica, che circola nel sangue, oppure come proteina cellulare. Il legame della fibronectina alle integrine, a livello della sequenza specifica RGD (Arg-Gly-Asp), è indispensabile affinché avvenga l'attivazione di tale proteina e la sua organizzazione in fibrille altamente insolubili, che garantiscono un microambiente dinamico per le cellule (54, 55). La fibronectina svolge un ruolo chiave nella migrazione, nel differenziamento e nell'adesione cellulare.

La laminina è la glicoproteina più abbondante delle membrane basali; è un eterodimero cruciforme, di cui sono state finora descritte 15 differenti isoforme, formato da tre subunità, α , β e γ , avvolte l'una intorno alle altre, unite a livello di un dominio detto "ad α -elica". La laminina è specializzata nella mediazione tra cellule e componenti dell'ECM e, attraverso tale interazione, interviene nel differenziamento, nella migrazione e nella sopravvivenza cellulare (56). E' stato dimostrato che nel cuore umano adulto le laminine 1 e 2 proteggono le CPC dall'apoptosi mentre ne stimolano la migrazione e la proliferazione (57).

La tenascina è una glicoproteina, costituita da più catene polipeptidiche, che contiene siti di legame per le integrine, i PG e le altre proteine della matrice. Sono state identificate 5 isoforme di TN, indicate come TN-C, -R, -W, -X, -Y, che intervengono nei processi di migrazione, proliferazione ed adesione cellulare. In particolare la TN-C non espressa nei tessuti adulti normali (46), risulta fortemente espressa in caso di processi infiammatori, di riparazione e di rimodellamento tissutale e in stati patologici come il cancro della mammella.

L'osteopontina (OPN) è una fosfoproteina glicosilata, sintetizzata da diversi tipi cellulari, tra cui fibroblasti ed osteoblasti. Essa svolge diverse funzioni, che includono il riassorbimento e la deposizione ossea, la modulazione della risposta immunitaria, la guarigione delle ferite, l'adesione e la sopravvivenza cellulare (47). Essa è inoltre coinvolta nella tumorigenesi, regolando la proliferazione cellulare, l'angiogenesi e la metastatizzazione (58).

L'ECM è una struttura altamente dinamica, in quanto sottoposta ad un continuo rimodellamento garantito dall'azione di enzimi prodotti da fibroblasti, cellule epiteliali, cellule endoteliali e leucociti, le metalloproteinasi (MMP). Tali enzimi degradano la matrice e la rendono capace di adattarsi e rispondere ai meccanismi attivati in diverse condizioni fisiologiche e patologiche (59). L'espressione delle MMP è indotta da una varietà di citochine e fattori di crescita e la loro attività è controllata da inibitori endogeni delle metalloproteinasi (TIMP), prodotti da diversi tipi cellulari come fibroblasti (60), cellule muscolari lisce (61) e macrofagi (62). Essi inattivano le proteasi dell'ECM, per contrastare un'eccessiva degradazione della matrice, preservando così l'integrità tissutale (62).

1.4. Microambiente miocardico

La capacità delle cellule miocardiche di sintetizzare le componenti dell'ECM varia tra un tipo cellulare e l'altro: i fibroblasti sono i tipi cellulari predominanti nell'interstizio cardiaco (63, 64) e i principali responsabili della produzione di collagene di tipo I e III e di fibronectina, mentre i cardiomiociti producono il collagene di tipo IV e VI, la laminina e i proteoglicani. Sebbene nel

miocardio siano stati identificati sei tipi di collagene, i collageni I e III sono i più espressi, nonché i principali responsabili del mantenimento della struttura tissutale e delle proprietà visco-elastiche del miocardio (65), mentre il collagene di tipo VIII è espresso prevalentemente durante lo sviluppo cardiaco, intervenendo nella formazione delle valvole cardiache (66). La fibronectina svolge nel cuore un ruolo importante nel rinnovamento delle cellule staminali cardiache e nella preservazione del loro stato indifferenziato, mentre le laminine intervengono durante l'organogenesi cardiaca che, non procede in caso di assenza della laminina 1 (67), nell'organizzazione e nell'allineamento dei cardiomiociti nel cuore (68, 69).

In condizioni fisiologiche, i fibroblasti cardiaci, sostengono l'omeostasi dell'ECM cardiaca. Essi sono definiti "cellule sentinelle" per la loro posizione strategica, in quanto vengono attivati in seguito a danno cardiaco e producono citochine e chemochine, che intervengono nel processo infiammatorio cardiaco (70). Durante il rimodellamento cardiaco, inoltre, si assiste ad un transdifferenziamento dei fibroblasti in miofibroblasti (71), che sebbene intervengano inizialmente nel processo riparativo, compromettono, successivamente, la funzionalità d'organo contribuendo all'espansione della cicatrice fibrotica (72). Infatti il processo riparativo può essere suddiviso in tre fasi, l'infiammatoria, la proliferativa e la maturativa (73). La fase infiammatoria ha inizio quando i leucociti invadono l'area infartuata, attratti da citochine e chemochine rilasciate dai cardiomiociti necrotici. Tali citochine attivano, inoltre, le MMPs, promuovendo la degradazione della matrice. Successivamente, durante la fase proliferativa, si ha la produzione di "segnali di arresto", ovvero citochine inibitorie, come l'interleuchina 10 e il transforming growth factor (TGF)- β , che fermano la reazione infiammatoria e inducono l'attivazione dei TIMP (74, 75). I fibroblasti, intanto, stimolati dall'azione combinata del TGF- β 1 e da un'aumentata tensione meccanica (76, 77) differenziano in miofibroblasti e sintetizzano abbondanti proteine dell'ECM nella zona infartuata. L'ultima fase, maturativa, è caratterizzata dalla formazione di legami crociati tra le fibre di collagene (78), che determinano la formazione di un'impalcatura extracellulare meno flessibile di

quella del miocardio sano e, quindi, conferiscono maggiore rigidità e resistenza meccanica alla cicatrice fibrosa (79).

Durante il rimodellamento cardiaco il collagene è la proteina maggiormente prodotta, ma anche altre importanti proteine vengono sintetizzate in maggiore quantità, come la fibronectina, prodotta da macrofagi e fibroblasti durante la fase proliferativa ed è essenziale per il differenziamento dei fibroblasti in miofibroblasti. La laminina, invece, è responsabile dell'attivazione delle MMPs con il conseguente rilascio di peptidi ad elevato potere chemiotattico, che favoriscono il processo infiammatorio (80, 81). Infine l'induzione durante la fase proliferativa della sintesi di proteine, quali la tenascina-C, tenascina-X, trombospondina e osteopontina, regola gli eventi cellulari dinamici del riparo cardiaco. In particolare, la Tenascina-C, si dispone lungo i bordi della zona infartuata e facilita il rimodellamento tissutale (82, 83).

1.5. Bioingegneria tissutale

La bioingegneria tissutale è un settore multidisciplinare che, combinando i principi e i metodi della bioingegneria e delle scienze della vita, consente di creare sostituti biologici utili al ripristino organico e funzionale di un tessuto o di un organo (84).

L'obiettivo della bioingegneria tissutale è quello di ottenere costrutti tridimensionali (scaffold) che possano integrarsi completamente con il tessuto ospite e svolgerne le stesse funzioni in vivo. E', pertanto, indispensabile che tali scaffold posseggano le stesse proprietà fisiche, chimiche, biologiche e meccaniche dei tessuti nativi e devono essere biocompatibili e biodegradabili, ovvero i prodotti derivati dalla loro degradazione non devono essere tossici né devono indurre risposta infiammatoria. In tal modo, tali tessuti bioingegnerizzati possono guidare il differenziamento delle cellule staminali residenti o integrate nello scaffold stesso verso le specifiche linee di interesse (85). Infatti, gli scaffold possono essere utilizzati come patch cardiaci impiantati soltanto come piattaforma ottimale per intensificare il reclutamento ed il differenziamento delle CPC residenti, grazie alla presenza di molecole bioattive, come i componenti dell'ECM e i fattori di crescita (86).

In alternativa, essi possono essere ripopolati in vitro prima dell'impianto in vivo per fornire un substrato tridimensionale che possa, al contempo, mimare l'ECM nativa e supportare la rigenerazione del tessuto danneggiato (87).

Gli scaffold per l'ingegneria tissutale possono essere ottenuti a partire da polimeri sintetici o da materiali naturali.

1.5.a Scaffold prodotti con polimeri sintetici

I biomateriali sintetici sono ampiamente utilizzati nella rigenerazione tissutale in quanto sono materiali altamente riproducibili e con proprietà fisiche modulabili. Tuttavia, sebbene biodegradabili e biocompatibili, essi inducono inevitabilmente una risposta immunitaria, mostrano spesso ridotta interazione con le cellule e l'ambiente biologico, per cui stimolano generalmente una scarsa risposta cellulare (86).

I polimeri sintetici biodegradabili più conosciuti ed utilizzati derivano dalla polimerizzazione dell'acido glicolico (PGA) e dell'acido lattico (PLA) (88). Si tratta di poliesteri alifatici biodegradabili e biocompatibili, utilizzati prevalentemente nell'ingegnerizzazione dei tessuti cardiovascolari, il primo, (89) o come scaffold nei tessuti osteo-articolari ingegnerizzati, il PLA (90). Tra gli idrogeli sintetici, quello maggiormente studiato per l'ingegneria tissutale è il glicole polietilenico (PEG) (91), impiegato nell'ingegnerizzazione del tessuto adiposo, oppure nell'aumento dei tessuti molli (92).

Per quanto riguarda la bioingegnerizzazione tissutale cardiaca, i polimeri elastomerici, come i poliuretani (PU), risultano i materiali più appropriati, per la possibilità di modularne le caratteristiche meccaniche e per la loro buona processabilità, biocompatibilità e biodegradabilità. Inoltre i PU sono in grado di resistere alle forze di deformazione dovute alla contrattilità miocardica e di ovviare al problema della rigidità dello scaffold (93).

Tuttavia gli scaffold da impiegare nella rigenerazione del miocardio dovrebbero riprodurre non solo le caratteristiche meccaniche e l'organizzazione strutturale del miocardio nativo, ma garantire anche un adeguato apporto di ossigeno e nutrienti, nonché presentare proprietà biologiche simili a quelle

del microambiente cardiaco. Pertanto, fondamentale è la scelta del materiale da utilizzare, ma è di primaria importanza anche l'architettura dello scaffold, e la scelta delle molecole bioattive con cui funzionalizzare il costruito, dal momento che frammenti di proteine dell'ECM, fattori di adesione e fattori di crescita, attivano e modulano il processo di proliferazione e di differenziamento cellulare.

1.5.b Scaffold prodotti con polimeri naturali

Generalmente i polimeri naturali sono altamente biocompatibili, innescano in vivo una debole risposta infiammatoria e favoriscono l'adesione, la proliferazione ed il differenziamento cellulare. Tra i diversi biomateriali impiegati per la creazione di scaffold naturali i più utilizzati sono il collagene, la fibrina e il chitosan. Tra questi il collagene, in quanto proteina strutturale fondamentale dell'ECM dei tessuti connettivi, è stato il primo ad essere studiato (94, 95). Scaffold a base di collagene naturale sono stati impiegati sotto forma di soluzioni iniettabili, medicamenti ed innesti cutanei (96). Tuttavia, nonostante i molteplici vantaggi del collagene, tra cui biodegradabilità, biocompatibilità e multifunzionalità, la sua capacità di evocare una risposta immunitaria ne ha notevolmente ridotto l'impiego clinico (97). La fibrina, componente fondamentale del sangue responsabile del processo emostatico, può essere ricavata dal plasma autologo e presenta un alto potenziale nella rigenerazione dei tessuti, nella guarigione delle ferite e soprattutto nella neovascolarizzazione. La fibrina è anche disponibile in commercio, come gel iniettabile o microsfele ingegnerizzate, e può essere iniettata direttamente nella regione anatomica di interesse (98). Poiché biocompatibile, biodegradabile e molto maneggevole è diventata molto popolare negli ultimi anni l'impiego di gel di fibrina nei tessuti ingegnerizzati, sia in studi in vitro, per la coltura di diversi tipi cellulari, di cui stimolano adesione, proliferazione e differenziamento (99-101), che in vivo (102). Un altro polimero naturale, e precisamente un polisaccaride con struttura simile ai GAG, utilizzato in bioingegneria tissutale, è il chitosan (103, 104). Quest'ultimo, dapprima impiegato in medicina rigenerativa per la riparazione ossea e del derma, è stato successivamente utilizzato, in combinazione con il collagene, anche nella rigenerazione del miocardio (97).

1.5.c Scaffold biologici

Dal momento che, in vivo, le cellule sono accolte in un microambiente altamente specializzato, tessuto specifico e dinamico, lo scaffold ideale dovrebbe presentare caratteristiche biologiche e meccaniche quanto più possibile simili all'ECM nativa (105). L'ambizioso obiettivo che si sta perseguendo in ingegneria tissutale cardiaca consiste nella ricostruzione del compartimento extracellulare dei tessuti danneggiati mediante scaffold biologici tridimensionali, utilizzando la matrice extracellulare decellularizzata. Per decellularizzazione di un tessuto o di un organo si intende la completa rimozione della componente cellulare con l'intento di ottenere un'impalcatura extracellulare preservata. Il vantaggio di questo approccio sta nella possibilità di ottenere scaffold di natura allogenica o xenogenica che possano essere ricellularizzati con cellule autologhe (106). L'impiego di matrici extracellulari, ottenute dalla decellularizzazione di tessuti allogenici e xenogenici è sempre più frequente nella medicina rigenerativa e nelle strategie di ingegnerizzazione tissutale, come nel caso di impianti di valvole cardiache (107, 108), vasi sanguigni (109), cute (110), nervi (111, 112), muscolo scheletrico (113), tendini (114), legamenti (115), sottomucosa intestinale (116, 117), vescica (118, 119) e fegato (120). Recenti applicazioni prevedono perfino l'utilizzo di scaffold ottenuti dalla decellularizzazione di interi organi (121-125). L'efficacia di un metodo di decellularizzazione dipende da molti fattori, tra cui la cellularità, la densità, il contenuto di lipidi e lo spessore del tessuto o organo di partenza.

Finora sono stati utilizzati numerosi metodi di decellularizzazione, che vengono essenzialmente classificati come chimici, enzimatici o fisici (Tab. 1) (125).

Tra quelli chimici si distinguono detergenti ionici, non-ionici e zwitterionici, che solubilizzano le membrane cellulari, dissociano il DNA dalle proteine e sono efficaci nel rimuovere la componente cellulare dal tessuto. Tra gli agenti chimici più utilizzati vanno menzionati il sodio dodecilsolfato (SDS) (126), detergente ionico, il Triton X-100 (126), non-ionico, gli alcool, come l'isopropanolo, l'etanolo ed il metanolo (127). Gli enzimi più spesso impiegati comprendono nucleasi, tripsina, collagenasi, lipasi, termolisina ed α -galattosidasi (128). L'esposizione dei tessuti a forze fisiche o a

cicli di congelamento-scongelo rappresentano metodi fisici di decellularizzazione, da utilizzare in alternativa o in combinazione con quelli chimici.

Tuttavia tutti i metodi menzionati causano danni più o meno importanti a componenti dell'ECM, alterandone composizione e, di conseguenza, funzione. Infine, per evitare contaminazioni microbiche prima dell'impiego in vitro e, ancor più, dell'impianto in vivo, è fondamentale sterilizzare gli scaffold biologici decellularizzati mediante antibiotici ed antimicotici, quali penicillina, streptomina ed amfotericina B.

2. Scopo dello studio

L'incidenza di malattie cardiovascolari nel mondo occidentale, il conseguente peso che i pazienti affetti comportano sulla spesa sanitaria, insieme alle difficoltà legate alle opzioni terapeutiche attualmente disponibili, hanno imposto la ricerca di strategie d'intervento avanzate e volte, soprattutto, alla cura più che al trattamento sintomatico della cardiopatia ischemica e delle sue complicanze.

Con la scoperta della presenza di cellule primitive cardiache, in grado di mantenere il fisiologico turn-over cellulare, la terapia cellulare della cardiopatia ischemica si è prepotentemente proposta quale opzione terapeutica in grado di ripristinare l'integrità e, quindi, la funzione del miocardio infartuato. Tuttavia, nonostante l'entusiasmo iniziale suscitato da numerosi studi pre-clinici, la promessa di rigenerare il miocardio attraverso la terapia cellulare non è stata mantenuta nei vari trials clinici approvati. Tale insuccesso è senz'altro, in buona parte, legato a cambiamenti del microambiente miocardico che si verificano in corso di cardiomiopatia ischemica e che si consolidano e complicano in caso di malattia cronica e che non vengono modificati con la terapia cellulare.

Pertanto, sempre perseguendo l'obiettivo di riparare ai danni causati al miocardio dall'insulto ischemico, la terapia cellulare cardiaca si è evoluta verso la medicina rigenerativa cardiaca. Quest'ultima si avvale di interventi multidisciplinari che coinvolgono biologi, biotecnologi, bioingegneri e medici, con il fine ultimo, comune, di ricreare il miocardio umano nella sua componente cellulare ed extra-cellulare.

In quest'ottica, l'obiettivo del presente studio è costruire uno scaffold tridimensionale bioingegnerizzato che possenga le proprietà fisiche, chimiche e biologiche del miocardio, sì da poter essere impiegato in medicina rigenerativa per riparare il miocardio infartuato.

In particolare, dal momento che è indispensabile ripristinare sia la componente cellulare che quella extracellulare, ho allestito e ripopolato con cellule primitive cardiache scaffold sintetici e naturali

per poi valutarne gli effetti su sopravvivenza, capacità di attecchire e differenziamento delle cellule primitive cardiache. L'importanza di confrontare scaffold sintetici, ottenuti per prototipazione di biomateriali, con scaffold biologici, ottenuti per decellularizzazione del miocardio umano e allestiti come patch o come forma iniettabile, risiede nella necessità di definire il costrutto tridimensionale ideale. Infatti, mentre i biomateriali possono essere facilmente modificati e progettati nella loro composizione ed architettura per soddisfare parametri fisici, reologici e chimici, essi non posseggono alcuna attività biologica. A tale inconveniente si può ovviare incorporando molecole bioattive nel costrutto, ma in nessun caso è possibile ripristinare la serie, unica e caratteristica, di segnali extracellulari di un tessuto naturale. Di conseguenza, un tessuto decellularizzato, conservando la composizione del microambiente nativo con cui le cellule interagiscono, conserva anche i segnali che esse ricevono, ma, d'altro canto, conserva anche le proprietà fisiche, che non possono essere modificate. Inoltre, gli agenti chimici utilizzati per la decellularizzazione, in modo più o meno importante, possono depauperare la matrice di alcune componenti, come i fattori di crescita. E', quindi, fondamentale individuare il metodo di decellularizzazione più efficace e più conservativo per il tessuto di interesse per mantenerne la composizione, sempre considerando che le proprietà meccaniche resteranno immutate. Pertanto, per poter procedere correttamente nel confronto tra scaffold sintetici e naturali, ho dapprima selezionato il protocollo di decellularizzazione più efficace per il miocardio umano e caratterizzato le matrici decellularizzate ottenute, per poi rapportarle ai costrutti sintetici.

3. Materiali e metodi

3.1. Pazienti

Frammenti di ventricolo sinistro sono stati ottenuti da cuori umani adulti espantati per insufficienza cardiaca post-ischemica allo stadio terminale (n=22, età media 55.8 ± 3.1 anni, 16 maschi, 6 femmine, frazione d'eiezione media $25 \pm 1\%$). I campioni sono stati ottenuti in modo anonimo e con il consenso informato dei pazienti. Tutte le procedure sperimentali sono state condotte in conformità con i principi delineati nella dichiarazione di Helsinki. In particolare i frammenti tissutali sono stati sminuzzati e sottoposti a digestione enzimatica per l'allestimento della coltura primaria. Altri frammenti sono stati congelati a -80°C in RNA later (Ambion, ThermoFisher Scientific, USA) e a secco, rispettivamente per l'estrazione degli acidi nucleici e il taglio al criostato. Le sezioni così ottenute sono state sottoposte a diversi protocolli di decellularizzazione.

3.2. Allestimento di scaffold

3.2.1. Scaffold sintetici

Gli scaffold biomimetici, progettati per la terapia a base di cellule staminali per la rigenerazione in situ del miocardio infartuato, sono stati fabbricati tramite tecniche di prototipazione rapida (RP), a partire da polimeri sintetici degradabili e biocompatibili, con una geometria in grado di assicurare un corretto apporto di ossigeno e nutrienti alle CPC. Gli scaffold sintetici sono stati appositamente realizzati da ricercatori dell'Università Campus Bio-medico di Roma in collaborazione con il Dipartimento di Meccanica del Politecnico di Torino nell'ambito del progetto "Materiali bioartificiali e scaffold biomimetici per la terapia a base di cellule staminali nella rigenerazione del miocardio (STARIGEN)".

In particolare è stato sintetizzato un poliuretano termoplastico KBC2000 a base di Policaprolattone, 1,4-butandiisocianato ed estere etilico della lisina.

Per la realizzazione degli scaffold è stato utilizzato un dispositivo di stampa 3D in dotazione presso l'Università "Campus Biomedico" di Roma.

Per lo studio sono stati utilizzati scaffold funzionalizzati con laminina o con gelatina. La tecnica di funzionalizzazione prevede una pre-funzionalizzazione tramite plasma ad Ar/Acido Acrilico, seguita dal grafting covalente di laminina-1 o gelatina, utilizzando la chimica delle carbodiimidi.

3.2.2. Scaffold biologici di matrice decellularizzata

a) Sezioni di matrice decellularizzata

Frammenti di ventricolo sinistro sono stati congelati e tagliati al criostato, al fine di ottenere sezioni di miocardio dello spessore di 300 μm . Le sezioni così ottenute sono state decellularizzate allo scopo di ottenere scaffold tridimensionali da ripopolare con cellule primitive o di allestire idrogeli tridimensionali di matrice e fibrina.

La decellularizzazione è stata eseguita secondo 4 diversi protocolli sperimentali precedentemente descritti, al fine di individuare quello più efficiente per il miocardio umano.

Il primo protocollo testato, in accordo con quanto riportato da *Oberwallner* (126), è della durata di due giorni e prevede l'utilizzo di una soluzione di TRIS (10mM) ed EDTA (0,1%) a pH 7.4, quindi di un trattamento in SDS alla concentrazione dello 0,5%, seguito da un'incubazione in FBS al 12% per rimuovere i residui di acidi nucleici (127). Sia dopo il trattamento con SDS che dopo l'incubazione con FBS, le sezioni sono state lavate in PBS, secondo quanto riportato nella Tabella 2. Con il secondo protocollo, seguendo quanto descritto da *Godier-Furnémont* (128), nel corso di due giorni, le sezioni di miocardio sono state decellularizzate utilizzando una soluzione di TRIS (10mM) ed EDTA (0,1%) a pH 7.4, quindi SDS alla concentrazione dello 0,5% e un lavaggio overnight in PBS. Per ottenere una rimozione completa degli acidi nucleici, in questo caso, è prevista un'incubazione in DNasi (50UI/ml) e RNasi (1UI/ml) e un secondo lavaggio overnight in HBSS al 10% (Tab.2).

Il terzo protocollo testato, descritto da *Mirsadraee* (129), prevedeva il susseguirsi, nell'arco di tre giorni, di un trattamento con una soluzione di EDTA allo 0,1% w/V contenente inibitori delle proteasi (aprotinina, 10 KIU/ml), una prima incubazione con buffer ipotonico (TRIS-HCl 10mM,

pH8.0), quindi una in SDS allo 0,1%, seguita da un lavaggio in PBS, e un'ultima incubazione con DNasi (50UI/ml) e RNasi (1UI/ml) (Tab.2).

Con il quarto ed ultimo protocollo, secondo quanto riportato da *Ott* (130), dopo un trattamento iniziale con SDS all'1% e un'incubazione con Triton-X100 all'1%, la procedura di decellularizzazione veniva completata da un lavaggio in PBS contenente streptomicina e penicillina (100UI/ml) (Tab.2) .

Nell'esecuzione di ciascun protocollo sono state rispettate le condizioni sperimentali descritte dai rispettivi Autori.

Al termine della decellularizzazione alcune sezioni sono state fissate in formalina, incluse in paraffina e tagliate al microtomo per le successive analisi istochimiche ed immunoistochimiche, altre sezioni decellularizzate sono state in parte congelate in RNA later per l'estrazione degli acidi nucleici e a secco per l'estrazione proteica ed in parte sono state liofilizzate e solubilizzate. Inoltre altre sezioni ancora sono state poste su piastre di coltura da 35mm, sterilizzate e utilizzate come supporto per la coltura cellulare.

b) Idrogeli matrice-fibrina

Dopo liofilizzazione overnight, le sezioni sono state solubilizzate in una soluzione di pepsina (Sigma-Aldrich, USA) in HCl 0.1M (1 mg di pepsina/ml di HCl) (Sigma-Aldrich), in agitazione a 37°C, utilizzando 1ml di soluzione per 10mg di tessuto, in accordo con quanto riportato in letteratura (101). Completata la solubilizzazione, la soluzione è stata neutralizzata con NaOH 1N (Sigma-Aldrich) per inattivare la pepsina.

Sono stati realizzati diversi gel di matrice e fibrina, utilizzando sia una preparato iniettabile disponibile in commercio (TISSEEL, Baxter, USA), che una fibrina prodotta in laboratorio a partire da fibrinogeno (Sigma-Aldrich) e trombina (Sigma-Aldrich). In particolare, i gel sono stati allestiti in chamber slides da 8 pozzetti (Nunc, ThermoScientific, USA) in modo da testare rapporti matrice:fibrina di 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, o di 4:1, per entrambe le preparazioni (fig.9).

3.3. Caratterizzazione degli scaffold

3.3.1. Scaffold sintetici

In collaborazione con il Dipartimento di Ingegneria Meccanica e Aerospaziale del Politecnico di Torino, sono stati effettuati studi reologici sul poliuretano termoplastico KBC2000, per riprodurre le condizioni di stress termo-meccanico del processo di prototipazione rapida, analizzando:

- la transizione di fase (sol-gel) all'aumentare della temperatura;
- la viscosità in funzione della velocità di taglio a varie temperature;
- le proprietà viscoelastiche;
- lo sforzo di soglia, rappresentato dal minimo sforzo necessario per indurre il flusso, nell'estrusione dei polimeri;
- la stabilità del gel durante l'estrusione in condizioni isoterme;
- la viscosità in funzione del tempo, dopo l'applicazione di uno sforzo di taglio.

Gli scaffold sintetizzati, inoltre, sono stati sottoposti ad una sollecitazione dinamica ciclica mediante un bioreattore (bioreattore Mutitrack). A tal fine, il bioreattore è stato munito di afferraggi, adatti a fornire agli scaffold deformazioni cicliche uniassiali simil-fisiologiche, per valutarne la resistenza meccanica con direzione di applicazione dello sforzo sia parallela all'asse longitudinale delle fibre, sia inclinata di 45° rispetto a tale asse.

3.3.2. Scaffold biologici

a) Analisi dell'efficacia della decellularizzazione

Estrazione e quantizzazione del DNA

Il DNA genomico è stato estratto da sezioni di miocardio, native e decellularizzate secondo i diversi protocolli, utilizzando il kit AllPrep DNA/RNA Mini (QIAGEN, Germania), in accordo con il protocollo fornito dalla ditta produttrice.

L'acido nucleico è stato quindi quantizzato mediante spettrofotometro NanoDrop 1000 (ThermoScientific GE Healthcare Life Sciences, Regno Unito) ed è stata eseguita una valutazione qualitativa dello stesso mediante elettroforesi su gel di agarosio con etidio bromuro.

Analisi istochimica

Le sezioni di miocardio decellularizzato secondo i diversi protocolli e fissate in formalina tamponata al 10%, sono state successivamente lavate in acqua, disidratate secondo una scala ascendente di alcool etilico ed incluse in paraffina. I campioni così inclusi sono stati tagliati al microtomo in sezioni dello spessore di 5 μ m e montate su vetrini polilisinati. Per valutare il grado di decellularizzazione e la morfologia le sezioni sono state sparaffinate, reidratate e colorate con un kit di colorazione rapida con Ematossilina ed Eosina (Bio-Optica, Italia), seguendo le indicazioni fornite dalla casa produttrice. L'osservazione è avvenuta mediante un microscopio Leica DM2000LED, equipaggiato con una fotocamera digitale Leica ICC50 HD (Leica Microsystems, Germania).

b) Analisi della composizione della matrice decellularizzata

Analisi quantitativa di Collagene e GAG

Per valutare la composizione dell'ECM decellularizzata, sono stati quantizzati mediante saggi colorimetrici, utilizzando in ciascun saggio 20 mg di tessuto decellularizzato mediante i diversi protocolli, il Collagene (Sircol Collagen Assay, Biocolor Life Science Assays, Regno Unito) e i GAG (Sulfated Glycosaminoglycan Assay, Biocolor Life Science Assays), seguendo il protocollo del fornitore.

Estrazione proteica ed array per fattori di crescita

Per valutare la presenza dei fattori di crescita nelle matrici decellularizzate, ottenute mediante i diversi protocolli, sono stati utilizzati specifici microarray disponibili in commercio (Human Growth Factor Antibody Array C1, RayBiotech, USA). 200 mg di ciascun campione, per ciascuna matrice decellularizzata con i diversi protocolli, sono stati omogenizzati in 500 μ l di buffer di lisi (Tris-HCl pH 7.4 50mM, EDTA 5mM, NaCl 250mM, Triton-X100 0.1%, DTT 0.01M, PMSF 0,2 mM, Protease inhibitor 1X) e successivamente incubati a 4°C per 30 minuti. In seguito tutti i campioni sono stati centrifugati a 14.000 rpm per 30 minuti a +4°C e sono stati prelevati i surnatanti contenenti gli estratti proteici totali. La concentrazione proteica è stata poi determinata attraverso il

metodo di Bradford, usando come standard l'albumina di siero bovino. Successivamente 60 µg di ciascun campione sono stati utilizzati per l'ibridazione delle membrane, seguendo il protocollo fornito dalla ditta produttrice. Il segnale è stato visualizzato mediante autoradiografia, utilizzando una soluzione chemiluminescente (Chemiluminescent HRP substrate, Millipore, USA) e lastre autoradiografiche (Fujifilm, Giappone).

Analisi istochimica

Per valutare la presenza di fibre elastiche, collagene e glicoproteine, vetrini polilisinati allestiti con sezioni di miocardio decellularizzato come precedentemente descritto (3.3.2.a - Analisi Istochimica) sono state sparaffinate, reidratate e colorate con kit di colorazione per la Tricromica secondo Masson (Bio-Optica), la Tricromica secondo Gomori (Bio-Optica), il Rosso Sirio Picrato (Bio-Optica), la reazione di PAS secondo le modifiche di Morel-Maronger (Bio-optica). La colorazione è stata eseguita seguendo il protocollo fornito dal produttore.

L'osservazione è avvenuta mediante un microscopio Leica DM2000LED, equipaggiato con una fotocamera digitale Leica ICC50 HD (Leica Microsystems).

3.4. Isolamento e coltura delle CPC

Le cellule primitive cardiache sono state isolate come descritto in *Freshney RI. "Culture of animal cells"* (131), con opportune modifiche. Brevemente, i frammenti tissutali sono stati sminuzzati e successivamente digeriti incubandoli con tripsina-EDTA allo 0,25% e collagenasi II (Sigma-Aldrich) allo 0,1% (w/v). I cardiomiociti sono stati rimossi mediante centrifugazione a bassa velocità e, successivamente, il sovranatante è stato fatto passare attraverso filtri di 40 µm (BD Falcon, USA). Le cellule così ottenute sono state piastrate in mezzo DMEM/F12 (Sigma-Aldrich), arricchito con siero fetale bovino al 10% (Invitrogen, USA), glutazione (0,2 mM, Sigma-Aldrich), bFGF (Peprotech, USA), penicillina e streptomina (LifeTechnologies, Regno Unito).

Una volta raggiunta la confluenza di circa il 75%, le cellule sono state staccate con tripsina-EDTA allo 0,25% e sono state isolate le cellule CD117-positive dai fibroblasti.

La separazione delle CPC è avvenuta mediante selezione immunomagnetica (Miltenyi Biotec, Germania). In particolare, i fibroblasti sono stati rimossi mediante selezione positiva con particelle magnetiche anti-fibroblasti; essi sono stati fatti passare attraverso colonne poste in un campo magnetico e, successivamente, la frazione cellulare negativa è stata incubata con anticorpi diretti contro CD117 coniugati a particelle magnetiche. Le cellule CD117-positive, isolate e purificate, sono state piastrate ad una densità di circa 4×10^3 cellule/cm² in mezzo DMEM/F12 con 10% FBS (Sigma-Aldrich), FGFb (Peprotech), glutazione (Sigma-Aldrich) e penicillina-streptomina (Life Technologies). Le cellule CD117-positive, tra il primo e il secondo passaggio, sono state utilizzate per la caratterizzazione e gli esperimenti successivi

3.5. Realizzazione di scaffold tridimensionali cellularizzati

3.5.1. Scaffold sintetici

Le CPC sono state messe in coltura per 7, 14 e 21 giorni su scaffold in poliuretano nudo e su scaffold funzionalizzati con laminina-1 e gelatina (diametro 6mm), precedentemente sterilizzati mediante esposizione agli UV per 40 minuti. Inoltre, sono state utilizzate come controllo CPC in coltura su piastre da 35 mm non rivestite. I costrutti sono stati osservati mediante un microscopio a contrasto di fase invertito CKX41 (Olympus, Giappone), dotato di una fotocamera digitale (Color ViewIIIu Soft Imaging System).

3.5.2. Scaffold biologici

Le sezioni di matrice decellularizzata sono state disposte su piastre petri da 35 mm di diametro (BD Falcon), sterilizzate mediante esposizione a raggi UV per 40 minuti e successivamente idratate con mezzo DMEM/F12 (Sigma-Aldrich, USA) per 3 giorni. Le CPC sono state seminate sulle sezioni decellularizzate secondo i 4 protocolli sperimentali, alla densità di 5×10^5 cellule/piastra.

Scaffold biologici cellularizzati sono stati allestiti incorporando le CPC durante il processo di gelificazione dei gel di fibrina e matrice o mettendole in coltura sulla superficie degli stessi, ad una densità di 10^5 cellule/0,75cm².

3.6. Estrazione dell'RNA e analisi del differenziamento delle CPC sugli scaffold

3.6.1 Sintetici

L'RNA totale è stato estratto dalle CPC seminate su piastre di controllo e su scaffold in poliuretano, con e senza funzionalizzazione, utilizzando il kit RNeasy Micro (QIAGEN), come da protocollo. L'RNA isolato è stato quantizzato mediante Nanodrop1000. Quindi 100 ng di RNA di ciascun campione, sono stati retrotrascritti in cDNA con il QuantiTectReverse Trascrizione kit (QIAGEN), seguendo il protocollo fornito dalla ditta produttrice.

Per valutare l'espressione genica è stato utilizzato il QuantiFast SYBR Green PCR Kit (QIAGEN), allestendo miscele di reazione da 25 µl in triplicato per ciascun campione. Nello specifico sono stati utilizzati QuantiTect Primer Assays (QIAGEN) per i geni riportati in Tabella 3.

L'indagine di Real-Time PCR è stata condotta tramite l'impiego di un termociclatore con sistema di acquisizione Mastercycler ep realplex⁴ S (Eppendorf, Germany).

A PCR completata sono state effettuate le curve di melting per valutare la specificità e la purezza dei prodotti di amplificazione.

La variazione dell'espressione genica in ciascun campione, rispetto al controllo, è stata calcolata applicando il metodo del $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizzando come normalizzatore interno il gene housekeeping GAPDH.

3.6.2. Biologici

Dopo 7 giorni di coltura, le CPC sono state staccate dalle sezioni decellularizzate con tripsina/EDTA allo 0,25%. L'RNA totale è stato estratto e successivamente retrotrascritto in cDNA con gli stessi metodi descritti nel paragrafo 3.6.1.

L'espressione di geni coinvolti nel differenziamento cardiaco è stata valutata mediante real-time PCR, usando il kit Real MasterMix SYBR ROX (5 PRIME, Germania). Sono state allestite miscele di reazione da 25 µl in triplicato per ciascun campione. Per l'amplificazione è stato utilizzato il termociclatore con sistema di acquisizione Mastercycler ep realplex⁴ S (Eppendorf).

I primers impiegati nello studio sono stati costruiti utilizzando il software Primer3 disponibile online (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) a partire dalla CDS (*coding sequence*) dell'RNA messaggero maturo depositata in GeneBank.

I primers costruiti sono stati testati mediante PCR classica per la loro specificità nell'amplificare il tratto di interesse e poi in Real-Time PCR per verificarne l'efficienza. Le sequenze dei primers impiegati sono riportate in Tabella 4.

L'analisi dell'espressione genica è stata eseguita come riportato nel paragrafo 3.6.1.

3.7. Analisi istologica degli idrogeli matrice-fibrina

I gel di matrice-fibrina, con e senza le cellule, sono stati fissati in formalina tamponata al 10%, e successivamente processati, come precedentemente descritto.

Le sezioni dello spessore di 5 μ m ottenute al microtomo sono state colorate con un kit di colorazione rapida con Ematossilina ed Eosina (Bio-Optica), seguendo le indicazioni fornite dalla casa produttrice. L'osservazione è avvenuta mediante un microscopio Leica DM2000LED, equipaggiato con una fotocamera digitale Leica ICC50 HD (Leica Microsystems).

3.8. Analisi statistica dei dati

L'analisi statistica dei dati provenienti dal confronto di due gruppi è stata effettuata mediante test-t Student, mentre per il confronto di gruppi multipli è stato utilizzato il test-t di Student con la correzione di Bonferroni. Le differenze sono state considerate significative con valori di p inferiori o uguali a 0,05.

4. Risultati

4.1. Scaffold sintetici

4.1.1. Caratterizzazione degli scaffold

Il poliuretano KBC2000 ha mostrato buone caratteristiche di riproducibilità chimico-strutturale.

Dalle analisi calorimetriche è emerso che il KBC2000 si presenta allo stato fuso ad una temperatura superiore ai 154°C. Ciò ha permesso di scegliere la temperatura di 155°C come quella ottimale per la fabbricazione di scaffold con geometria quadrata, controllata e riproducibile. In particolare, sono stati allestiti scaffold a doppio strato, con fibre del diametro di 150 µm e spaziatura di 500 µm, orientate di 90° per ciascuno strato, garantendo una porosità >70%.

I costrutti sono stati caratterizzati per le loro proprietà fisico-chimiche (ad es. analisi FTIR-ATR, XPS, angolo di contatto, etc.) e tali caratterizzazioni hanno evidenziato che anche la funzionalizzazione con proteine laminina-1 o gelatina è avvenuta con successo.

4.1.2. Effetti sulle CPC

Le CPC aderiscono alla superficie di tutti gli scaffold, ma, in particolare, su quelli funzionalizzati con laminina-1 si distribuiscono sia negli spazi tra le trabecole che lungo le trabecole stesse.

Dall'analisi dei livelli di espressione dei marcatori del differenziamento verso le tre linee cellulari cardiache è emerso che la funzionalizzazione con laminina-1 stimola significativamente il differenziamento delle CPC verso la linea cellulare dei cardiomiociti. Dopo 7 giorni di coltura, si assiste ad un aumento dell'espressione dei marcatori dei progenitori dei cardiomiociti, Nkx2.5 ($1,29 \pm 0,14$) e Mef2C ($2,14 \pm 0,48$), e della proteina citoplasmatica tipica dei precursori della stessa popolazione cellulare, l'actina α -sarcomerica ($2,06 \pm 0,16$), rispetto alle cellule cresciute in adesione su petri. Tale fenomeno è stato osservato anche dopo 14 giorni di coltura, con un aumento dell'espressione dell'actina α -sarcomerica ($5,41 \pm 0,59$) nelle cellule coltivate sugli scaffold funzionalizzati con laminina-1, rispetto alle cellule di controllo (Fig.1).

4.2 Scaffold biologici

4.2.1. Caratterizzazione degli scaffold

Il contenuto di DNA, estratto dalle matrici decellularizzate con i diversi protocolli, dal primo al quarto, è risultato rispettivamente di $46,33 \pm 5,3$ ng/mg, $9 \pm 2,1$ ng/mg, $96,7 \pm 12,2$ ng/mg e $17,33 \pm 2,22$ ng/mg (Fig.2).

Dalle colorazioni istologiche con ematossilina/eosina è emerso che i protocolli 2 e 4 garantiscono una maggiore efficienza di decellularizzazione (Fig. 3, colonna A). Mentre la tricromica secondo Masson evidenzia, nelle sezioni decellularizzate con il protocollo 3, la presenza di porzioni di sarcoplasma di cardiomiociti, indice di una decellularizzazione incompleta (Fig. 3 colonna B). La colorazione con Rosso Sirio Picrato, la tricromica secondo Gomori e la PAS reazione dimostrano, rispettivamente, e per le sezioni ottenute con tutti e quattro i protocolli, la conservazione del collagene (Fig. 3, colonna C), delle proteine non collageniche (Fig. 3, colonna D) e delle fibre elastiche (Fig. 3, colonna E). Tuttavia, l'architettura della matrice decellularizzata con il protocollo 4 ha mostrato il miglior grado di preservazione (Fig. 3, riga Pr4).

Dai saggi colorimetrici, è evidente che la decellularizzazione preserva i glicosamminoglicani (Fig. 4, in alto) e il collagene (Fig. 4, in basso) nelle matrici decellularizzate con i 4 protocolli sperimentali.

L'array proteico per i fattori di crescita dimostra, invece, che anche le componenti solubili dell'ECM resistono al processo di decellularizzazione. Tuttavia, la presenza dei recettori per alcuni fattori di crescita (SCFR, M-CSFR, EGFR, VEGFR2, VEGFR3, IGF-1sR) evidenzia la persistenza delle membrane cellulari (Fig. 5).

Per quanto riguarda gli scaffold biologici di matrice e gel di fibrina, dalla colorazione con Ematossilina ed Eosina il rapporto 1:2 di matrice:fibrina risulta quello ottimale, poiché garantisce, per entrambe le formulazioni testate, una buona integrazione dell'ECM (Fig. 6). Inoltre, è possibile apprezzare la presenza delle CPC sia sulla superficie dei gel (Fig. 7) che nello spessore degli stessi (Fig. 8).

4.2.2. Effetti sulle CPC

Le CPC isolate mediante selezione immunomagnetica sono state tenute in coltura per 7 giorni sulle matrici decellularizzate secondo i 4 protocolli. Dopo 24 ore, le cellule in coltura sulle matrici decellularizzate con il protocollo 1 e 3 sono apparse in gran parte staccate e non vitali, a differenza delle cellule in coltura sulle matrici decellularizzate con i protocolli 2 e 4. Dall'analisi dell'espressione genica, mediante real-time PCR, nelle CPC in coltura sulle matrici decellularizzate mediante i protocolli 2 e 4, è emerso che in presenza della matrice decellularizzata con il protocollo 4, vi è una up-regolazione dei geni codificanti per i marcatori dei progenitori (Tbx3, Tbx5 e Cx43) e dei precursori (actina α -sarcomerica) dei cardiomiociti, dei progenitori (GATA6) e dei precursori (SMA) delle cellule muscolari lisce e dei precursori (FVIII) delle cellule endoteliali (Fig. 9).

5. Discussione

La terapia cellulare cardiaca rappresenta un approccio terapeutico promettente nel campo della medicina rigenerativa, dato il numero crescente di pazienti con insufficienza cardiaca terminale e le difficoltà che impediscono di garantire a tutti un trapianto d'organo (132).

Le cellule staminali, infatti, grazie alla loro plasticità e ad una illimitata capacità di dividersi, rappresentano un'interessante risorsa per la medicina rigenerativa, il cui scopo è quello di riparare tessuti e organi danneggiati, ripristinandone la funzione senza la necessità di sostituirli (133). Tra le cellule staminali testate, le cellule progenitrici cardiache residenti, capaci di differenziare nelle tre principali linee cellulari cardiache, possiedono il migliore potenziale terapeutico sfruttabile per un'eventuale terapia cellulare (134).

Tuttavia, nonostante iniziali risultati incoraggianti, restano ancora numerosi punti critici da superare per ottimizzarne l'efficacia terapeutica (135).

In vivo le cellule staminali sono accolte in un microambiente specializzato, la nicchia, che ne previene il differenziamento e ne sostiene la proliferazione (136). Le cellule di supporto, l'ECM e i fattori di crescita contribuiscono alla costituzione della nicchia e interagiscono con le cellule staminali, modulandone le attività biologiche (137).

Pertanto, poiché le componenti e l'organizzazione dell'ECM svolgono un importante ruolo nella regolazione dello sviluppo e delle funzioni di un organo, la medicina negli ultimi anni particolare attenzione è stata rivolta all'ingegneria tissutale allo scopo di migliorare il potenziale cellulare e ripristinare l'integrità dell'ECM danneggiata (138).

Sono state sperimentate diverse strategie basate sull'utilizzo di matrici 3D (scaffold) capaci di influenzare le funzioni cellulari e di promuovere la rigenerazione tissutale. La tendenza più recente della medicina rigenerativa, che va di pari passo con l'ingegneria tissutale, è quella di usare materiali biomimetici tessuto-specifici, degradabili e capaci di fornire segnali chimici e biologici che mimano quelli prodotti dal microambiente nativo (139, 140).

Gli scaffold per la rigenerazione del miocardio dovrebbero riprodurre le caratteristiche meccaniche e l'organizzazione strutturale del tessuto nativo, assicurare un adeguato apporto di ossigeno e nutrienti e favorire la vascolarizzazione (125).

In questo lavoro sono stati studiati scaffold prodotti mediante l'impiego di un poliuretano alifatico (KBC2000), simile a quello già studiato da Sartori et al. (141), capace di produrre strutture con proprietà elastomeriche adeguate per la coltura di mioblasti.

La tecnica di prototipazione rapida, usata per la produzione degli scaffold, come definita da Mironov et al. "organ prototyping", è una tecnologia di stampa 3D basata sulla deposizione di strati successivi di cellule e/o aggregati cellulari in un gel 3D, con conseguente progressiva maturazione del costrutto stampato verso un tessuto o un organo vivente perfuso e vascolarizzato (142). Questa tecnica, mai usata prima per la fabbricazione di scaffold miocardici, ha il vantaggio di consentire la conversione di modelli solidi computerizzati in modelli fisici e pertanto ha permesso di ottenere costrutti a doppio strato, con geometria porosa e proprietà anisotropiche simili a quelle del tessuto miocardico.

Inoltre, al fine di riprodurre i segnali biologici dell'ECM cardiaca in vivo, gli scaffold in poliuretano sono stati funzionalizzati con gelatina, come controllo, e con una molecola bioattiva, la laminina-1. La scelta specifica della laminina-1 è giustificata dal fatto che essa, in vivo, rappresenta la prima proteina ad essere espressa durante lo sviluppo embrionale del cuore (69) e viene riespressa nel cuore adulto in condizioni patologiche per guidare i processi di riparazione tissutale.

Confrontando le proprietà biologiche delle CPC, messe in coltura su scaffold non funzionalizzati e funzionalizzati con gelatina e laminina-1, è stato osservato che la funzionalizzazione con la laminina sostiene meglio la biologia delle CPC e ne induce il differenziamento verso la linea dei cardiomiociti.

Questi risultati suggeriscono che sia una buona strategia quella di modificare scaffold biomimetici con molecole bioattive capaci di evocare una risposta cellulare programmata utile per la rigenerazione del tessuto miocardico danneggiato. Resta comunque fondamentale la

sperimentazione su modelli animali in modo da valutare, in vivo, l'effettiva capacità di integrazione dei costrutti scaffold-CPC con il tessuto danneggiato ed il successivo recupero funzionale.

Tuttavia, nonostante l'utilità di scaffold biomimetici di sintesi, non bisogna sottovalutare che l'ECM presenta una struttura complessa costituita da specifiche proteine e la sua composizione varia notevolmente durante lo sviluppo e la maturazione del cuore (143).

Queste evidenze hanno spostato l'attenzione verso il possibile utilizzo di ECM ottenuta da tessuti decellularizzati.

Vari organi e tessuti costituiscono una fonte di ECM decellularizzata piuttosto attraente, in quanto tale ECM decellularizzata ha una composizione identica a quella dell'ECM nativa e pertanto possiede presumibilmente le stesse proprietà meccaniche. L'ECM decellularizzata può essere usata sotto forma di patch, coating bidimensionale o gel iniettabile (144-147).

Infatti, è già largamente diffuso l'impiego sull'uomo di matrici decellularizzate sia di origine allogenica che xenogenica, come nel caso delle matrici decellularizzate delle valvole cardiache, sostituite alle valvole con difetti allo stadio terminale, dimostrando sia l'applicabilità clinica dei protocolli di decellularizzazione sia la possibilità di trattare un gran numero di pazienti (148).

Dal momento che la matrice extracellulare guida l'organogenesi e i processi fisiologici di riparazione tissutale, l'utilizzo di matrici decellularizzate può essere considerata una valida alternativa ai costrutti sintetici, presentando una composizione chimica ideale, la conservazione dell'albero vascolare ed una perfetta struttura tridimensionale.

La decellularizzazione ottimale di matrici extracellulari prevede la rimozione della componente cellulare preservando allo stesso tempo e, per quanto possibile, la composizione nativa dell'ECM (125). La presenza di residui cellulari nell'ECM potrebbe comportare problemi di citocompatibilità in vitro e di risposta avversa in vivo attraverso l'attivazione di una risposta infiammatoria (149). Ad oggi una completa decellularizzazione non è ancora ottenibile, inoltre, il metodo da applicare varia a seconda delle caratteristiche tessuto-specifiche del campione di partenza (densità cellulare, spessore e struttura del tessuto).

Al fine di mettere a punto un protocollo innovativo in grado di garantire la migliore efficacia di decellularizzazione, preservando al contempo la struttura dell'ECM cardiaca umana, in questo studio sono stati messi a confronto 4 protocolli, designati con numeri arabi da 1 a 4 e precedentemente descritti.

Due dei quattro protocolli di decellularizzazione applicati su sezioni di tessuto cardiaco umano hanno permesso di ottenere una sufficiente rimozione cellulare ed una buona preservazione dell'architettura dell'ECM.

In seguito alla quantizzazione del DNA è emerso che, nelle matrici decellularizzate secondo i protocolli denominati 2 e 4 (fig.4), il contenuto di acido nucleico è inferiore a 50 ng per mg di tessuto (peso secco), valore indicato come soglia massima per ritenere accettabile il grado di decellularizzazione (125). Nelle matrici ottenute con i protocolli 1 e 3, invece, tale parametro non è rispettato. Pertanto solo i protocolli 2 e 4 sono in grado di determinare una decellularizzazione efficace. Anche dall'analisi istologica e dai risultati dei saggi colorimetrici è evidente che i protocolli 2 e 4 garantiscono una maggiore efficacia di decellularizzazione e, al contempo, una buona preservazione della componente collagenica e non, nonché delle fibre elastiche e dei GAG. Infatti è possibile notare dall'analisi istologica la persistenza del citoplasma dei cardiomiociti o dei nuclei nelle sezioni decellularizzate con i protocolli 1 e 3.

Poiché i GAG proteggono i fattori di crescita dalla proteolisi, è stata valutata la permanenza di questi ultimi nelle matrici decellularizzate, ed è emerso che il protocollo 4 permette di conservare importanti fattori di crescita, come il HGF, il VEGF e il IGF-1.

Le matrici ottenute dalla decellularizzazione secondo i diversi protocolli sono state utilizzate per la semina delle CPC. Di nuovo, i protocolli 2 e 4 si sono dimostrati più efficaci e hanno permesso di ottenere scaffold che meglio supportassero la vitalità delle CPC e la loro capacità a differenziare nelle tre linee cellulari cardiache (cardiomiociti, cellule endoteliali e cellule muscolari lisce).

Sulla base dei risultati finora ottenuti, il protocollo 4, per la sua rapidità e semplicità, si è dimostrato, anche rispetto al protocollo 2, più indicato ad ottenere una matrice meglio

decellularizzata e meglio conservata sia nella sua architettura che nel contenuto di proteine fondamentali come il collagene, di glicosamminoglicani e di fattori di crescita. Pertanto, esso costituirà il protocollo di riferimento per la produzione di scaffold naturali.

Infine, non va sottovalutata l'invasività dell'eventuale metodo di impianto degli scaffold, in vivo. Pertanto, sono ancora in corso studi sulla realizzazione di matrici naturali iniettabili, ottenute da matrice decellularizzata, liofilizzata, solubilizzata e miscelata a colle fibriniche, sia disponibili in commercio che riprodotte in laboratorio. A differenza degli altri polimeri finora impiegati, come la gelatina ed il collagene, la fibrina può evitare la risposta infiammatoria, dal momento che essa può essere estratta dal sangue del paziente, e possiede buone capacità nello stimolare l'homing, la proliferazione ed il differenziamento cellulare (86, 149).

Inoltre, l'utilità dei gel ottenuti combinando la fibrina e la matrice solubilizzata, risiede nel fatto che, una volta iniettati, potrebbero essere capaci di riprodurre l'organizzazione in fibre tipica dell'ECM, consentendo un'integrazione ottimale delle CPC in tutto il loro spessore.

Lo studio condotto evidenzia l'importante ruolo svolto dal microambiente extracellulare nel guidare la rigenerazione cardiaca. Nelle applicazioni di ingegneria tissutale per la rigenerazione del miocardio infartuato la scelta del tipo di scaffold, biomimetico o naturale, così come delle componenti bioattive dell'ECM da utilizzare in associazione ad essi, è di fondamentale importanza per l'ottimizzazione del processo di riparo tissutale. Gli scaffold potrebbero essere impiegati come patch cardiaci, ripopolati in vitro prima dell'impianto in vivo, oppure essere impiantati soltanto come piattaforma ottimale per promuovere il reclutamento ed intensificare il differenziamento delle CPC residenti.

6. Iconografia

Tabella 1: Agenti impiegati per la decellularizzazione tissutale

Agenti chimici	Funzione	Effetti sull'ECM
Acidi e basi	Solubilizzano i componenti citoplasmatici delle cellule, distruggono gli acidi nucleici, tendono a denaturare le proteine	Possono danneggiare il collagene, i GAG e i fattori di crescita
Soluzioni ipotoniche ed ipertoniche	Determinano la lisi cellulare per shock osmotico, distruggono le interazioni DNA-proteine	Lisano le cellule, ma non rimuovono efficacemente i residui cellulari
Detergenti non-ionici (es. Triton X-100)	Distruggono le interazioni DNA-proteine, lipidi-lipidi, lipidi-proteine e le interazioni proteine-proteine in misura minore	Rimozione cellulare efficace da tessuti sottili, distruzione dell'ultrastruttura dell'ECM e rimozione dei GAG, meno efficace dell'SDS
Detergenti ionici (es. SDS; sodio deossicolato; TritonX-200)	Solubilizzano le cellule e le membrane nucleari, tendono a denaturare le proteine	Rimuovono efficacemente i detriti nucleari e le proteine citoplasmatiche dai tessuti densi, tendono a distruggere l'ultrastruttura dell'ECM, rimuovono GAG e fattori di crescita e danneggiano il collagene
Detergenti zwitterionici (es.CHAPS)	Svolgono le funzioni dei detergenti ionici e di quelli non-ionici	Rimuovono efficacemente le cellule con una distruzione blanda dei tessuti sottili
Alcoli	Lisano le cellule per disidratazione, solubilizzano e rimuovono i lipidi	Rimuovono efficacemente le cellule dai tessuti densi, si legano alle proteine, come il collagene, facendole precipitare
Acetone	Lisa le cellule per disidratazione, solubilizza e rimuove i lipidi	Rimuove efficacemente le cellule dai tessuti densi, si lega alle proteine, come il collagene, facendole precipitare
Agenti fisici	Funzioni	Effetti sull'ECM
Temperatura (congelamento e scongelamento)	I cristalli di ghiaccio distruggono la membrana cellulare	La formazione dei cristalli di ghiaccio può distruggere o danneggiare l'ECM
Applicazione diretta di forze	Rimozione delle cellule distrutte	La forza applicata potrebbe danneggiare l'ECM
Pressione	La pressione potrebbe distruggere le cellule e rimuovere la componente cellulare	La pressione può distruggere l'ECM
Agenti enzimatici	Funzioni	Effetti sull'ECM
Nucleasi	Catalizzano l'idrolisi delle catene di ribonucleotidi e deossiribonucleotidi	Sono difficili da rimuovere dai tessuti per cui potrebbero evocare una risposta immunitaria
Tripsina	Scinde i legami peptidici dell'arginina e della lisina sul sito-C	Un'esposizione prolungata può distruggere l'ultrastruttura dell'ECM, rimuove le componenti dell'ECM come il collagene, la laminina, la fibronectina, l'elastina e i GAG
Dispasi	Scindono peptidi specifici, principalmente la fibronectina e il collagene IV	Un'esposizione prolungata può distruggere l'ultrastruttura dell'ECM, rimuove le componenti dell'ECM, in particolare la fibronectina e il collagene IV
Agenti chelanti (EDTA, EGTA)	Chelano gli ioni metallici distruggendo le adesioni delle cellule all'ECM	Sono usati tipicamente in associazione a metodi enzimatici o altri agenti, poiché sono inefficaci se usati da soli

Tabella 2: Protocolli per la decellularizzazione

Giorno 1				Giorno 2			Giorno 3		
	T	TEMPO	BUFFER	T	TEMPO	BUFFER/REAGENT	T	TEMPO	BUFFER
Pr1	T.A.	2 ore	10mM Tris, 0,1% p/v EDTA, pH 7,4	37°C	3 ore	FBS 12% in PBS 1x			
	T.A.	6 ore	SDS 0,5% p/v in PBS 1x	T.A.	3x10min	PBS 1x			
	T.A.	3x10min	PBS 1x	T.A.	Tutta la notte	PBS 1x			
	T.A.	Tutta la notte	PBS 1x	T.A.					DECELLULARIZZAZIONE COMPLETATA
Pr2	T.A.	2 ore	10mM Tris, 0,1% p/v EDTA, pH 7,4	T.A.	3 ore	50U/ml DNasi, 1U/ml RNasi in PBS 1x			
	T.A.	6 ore	SDS 0,5% p/v in PBS 1x	T.A.	3x10min	HBSS sterile			
	T.A.	3x30min	PBS 1x	T.A.	Tutta la notte	HBSS sterile			
	T.A.	Tutta la notte	PBS 1x	T.A.					DECELLULARIZZAZIONE COMPLETATA
Pr3	T.A.	3x30min	aprotinina 10KIU/ml;0,1% EDTA in PBS 1x	T.A.	24 ore	SDS 1% in buffer ipotonico	T.A.	3x30min	PBS 1x
	4°C	16 ore	Tris-HCl 10mM pH 8; aprotinina 10 KIU; EDTA 0,1% p/v				37°C	3 ore	50U/ml DNasi, 1U/ml RNasi in Tris-HCl10mM pH 7,5
							T.A.	3x30min	PBS 1x
									DECELLULARIZZAZIONE COMPLETATA
Pr4	T.A.	12 ore	SDS 1% in dH2O	T.A.	15min	dH2O			
				T.A.	30min	1% Triton X-100 in dH2O			
				T.A.	124 ore	PBS 1x; 100U/ml Pen-Strep			DECELLULARIZZAZIONE COMPLETATA entro il 6° giorno

T: temperatura; T.A. : Temperatura Ambiente

Tabella 3: Primers per la Real-Time PCR

Gene	Primer	Numero Cat.
GAPDH	Hs_GAPDH_1_SG QuantiTect Primer Assay (200)	QT00079247
NKX2-5	Hs_NKX2-5_1_SG QuantiTect Primer Assay (200)	QT00010619
MEF2C	Hs_MEF2C_1_SG QuantiTect Primer Assay (200)	QT00053368
ACTC1 (actina α -sarcomerica)	Hs_ACTC1_1_SG QuantiTect Primer Assay (200)	QT02306157
ETS1	Hs_ETS1_1_SG QuantiTect Primer Assay (200)	QT00049133
F8	Hs_F8_1_SG QuantiTect Primer Assay (200)	QT00059087
GATA6	Hs_GATA6_1_SG QuantiTect Primer Assay (200)	QT00233331
ACTA2 (actina del muscolo liscio)	Hs_ACTA2_1_SG QuantiTect Primer Assay (200)	QT00088102

Tabella 4: Primers per la Real-Time PCR

Gene	Primer Senso	Primer Antisenso	Lungh. nt
GAPDH	5'-CTCTCTGCTCCTCCTGTTCG-3'	5'-ACGACCAAATCCGTTGACTC-3'	114
Mef2C	5'-AGGCAGCAAGAATACGATGC-3'	5'-TACGGAAACCACTGGGGTAG-3'	88
Tbx3	5'-CTGTAGGGACATCGAACCTCA-3'	5'-CCATGCTCCTCTTTGCTCTC-3'	82
Tbx5	5'-GCAGTGATGACATGGAGCTG-3'	5'-TGCTGAAAGGACTGTGGTTG-3'	114
ACTC1	5'-TCGGGACCTCACTGACTACC-3'	5'-CAAAATCCAGGGCGACATAG-3'	125
CX43	5'-CGAGGACTATGAGGGCAAGA-3'	5'-TTCAGGTGTGTCGTTGGAAG-3'	113
ETS1	5'-TGGGGACATCTTATGGGAAC-3'	5'-TGGATAGGCTGGGTTGACTC-3'	88
FVIII	5'-GCTCTGGGATTATGGGATGA-3'	5'-TCTTGAAGTGGGACACTGC-3'	80
GATA6	5'-GTGTGCAATGCTTGTGGACT-3'	5'-TGTTCTTAGGTTTTCGTTTCCTG-3'	103
ACTA2	5'-CTGAGCGTGGCTATTCCTTC-3'	5'-TTCTCAAGGGAGGATGAGGA-3'	133

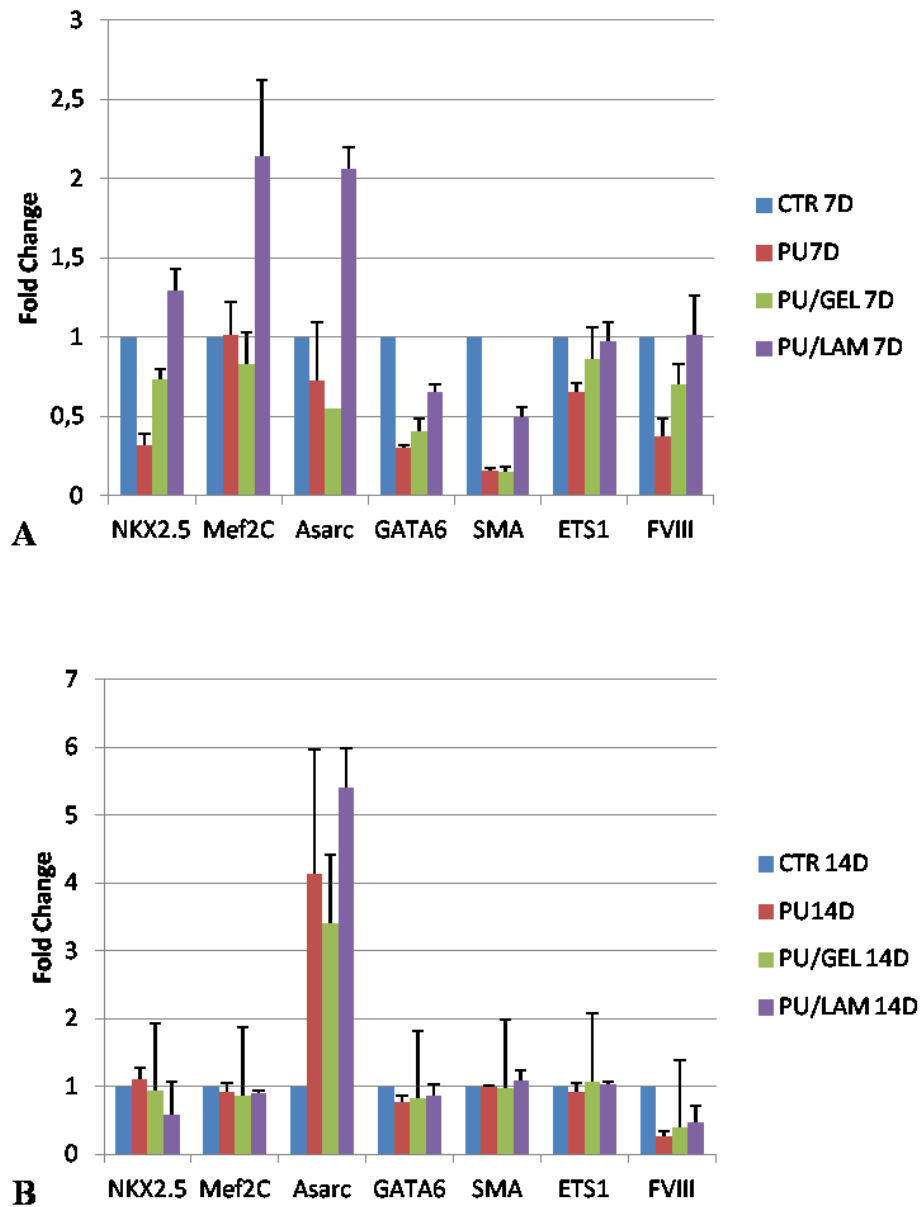


Fig. 1: Analisi dei livelli di espressione dei marcatori di differenziamento cardiaco delle CPC, isolate da cuori umani adulti, in coltura per 7 (A) e 14 (B) giorni, su piastre non rivestite (CTR), su scaffold in poliuretano non funzionalizzati (PU), su scaffold in poliuretano funzionalizzati con gelatina (PU/GEL) e su scaffold in poliuretano funzionalizzati con laminina-1 (PU/LAM).

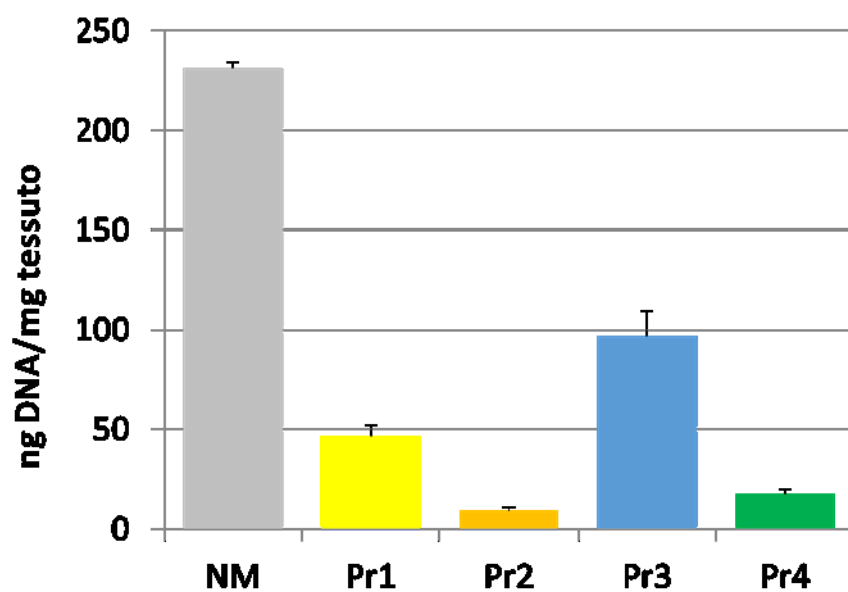


Figura 2: Valutazione del contenuto di DNA nelle matrici decellularizzate con i 4 protocolli sperimentali (Pr1, Pr2, Pr3, Pr4), rispetto alla matrice nativa (NM).

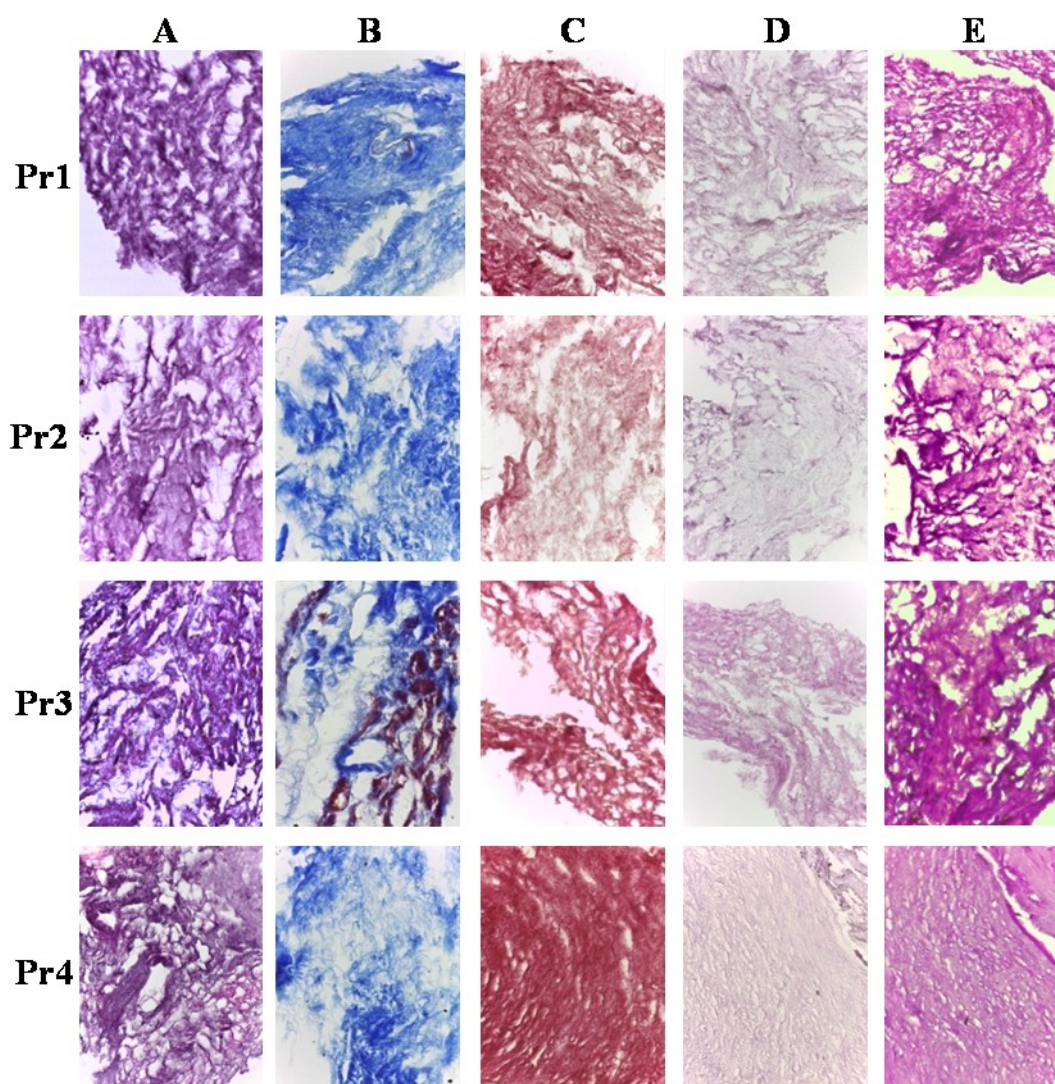


Figura 3: Colorazioni istologiche su sezioni di ventricolo sinistro decellularizzate con i 4 diversi protocolli sperimentali (Pr1, Pr2, Pr3, Pr4). (A) ematossilina/eosina, (B) tricromica di Masson, (C) Rosso Sirio Picrato, (D) tricromica secondo Gomori, (E) PAS Morel-Maronger modified. Ingrandimento 20X.

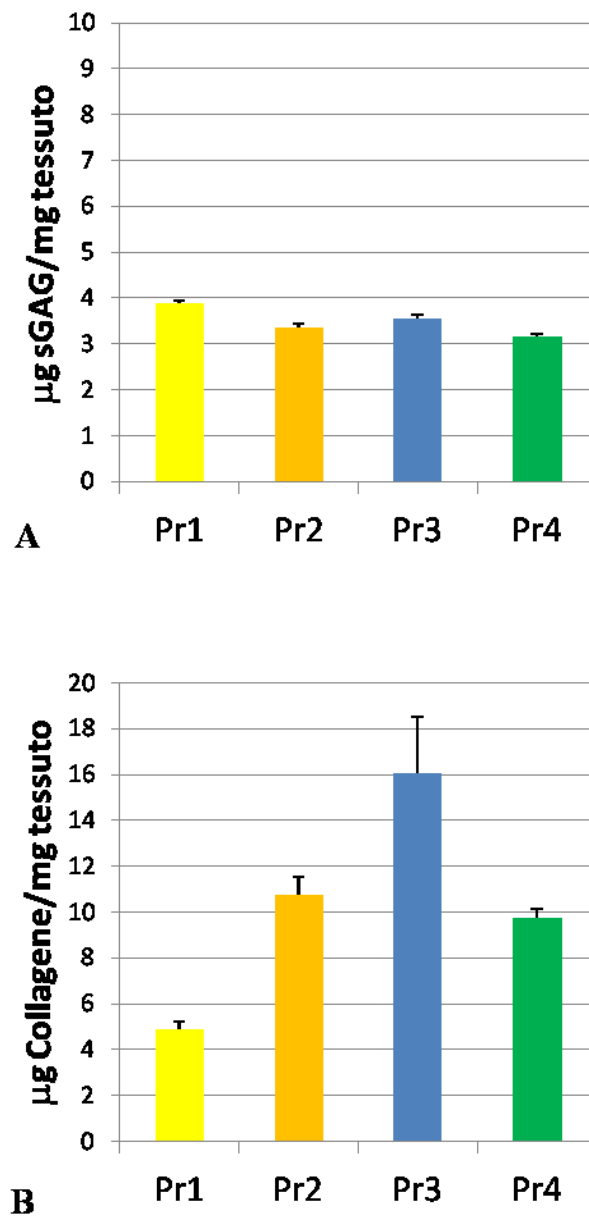
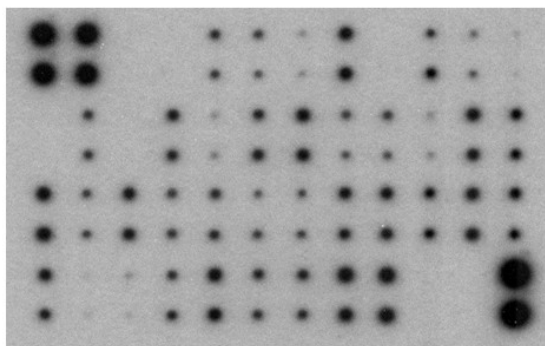


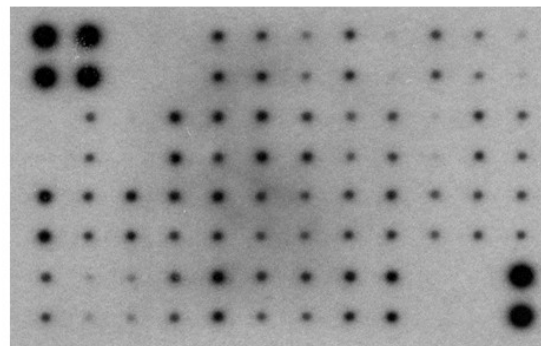
Figura 4: Analisi quantitativa per valutare la presenza GAG (A) e del collagene (B) nelle matrici decellularizzate con i quattro protocolli sperimentali (Pr1-Pr2-Pr3-Pr4).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	POS	POS	NEG	NEG	AREG	bFGF	b-NGF	EGF	EGFR	FGF-4	FGF-6	FGF-7
2	POS	POS	NEG	NEG	AREG	bFGF	b-NGF	EGF	EGFR	FGF-4	FGF-6	FGF-7
3	G-CSF	GDNF	GM CSF	HB EGF	HGF	IGFBP 1	IGFBP 2	IGFBP 3	IGFBP 4	IGFBP 6	IGF-1	IGF-1 sR
4	G-CSF	GDNF	GM CSF	HB EGF	HGF	IGFBP 1	IGFBP 2	IGFBP 3	IGFBP 4	IGFBP 6	IGF-1	IGF-1 sR
5	IGF-2	M-CSF	M-CSF R	NT-3	NT-4	PDGF R alpha	PDGF R beta	PDGF AA	PDGF AB	PDGF BB	PLGF	SCF
6	IGF-2	M-CSF	M-CSF R	NT-3	NT-4	PDGF R alpha	PDGF R beta	PDGF AA	PDGF AB	PDGF BB	PLGF	SCF
7	SCF R	TGF alpha	TGF beta	TGF beta 2	TGF beta 3	VEGF	VEGF R2	VEGF R3	VEGF D	BLANK	BLANK	POS
8	SCF R	TGF alpha	TGF beta	TGF beta 2	TGF beta 3	VEGF	VEGF R2	VEGF R3	VEGF D	BLANK	BLANK	POS

A



B



C

Figura 5: Array proteico per la valutazione della presenza dei fattori di crescita nelle matrici decellularizzate. (A) Schema dei fattori di crescita testati; membrane con spots rappresentativi dei fattori di crescita preservati nelle matrici decellularizzate con protocollo 2 (B) e con protocollo 4 (C).

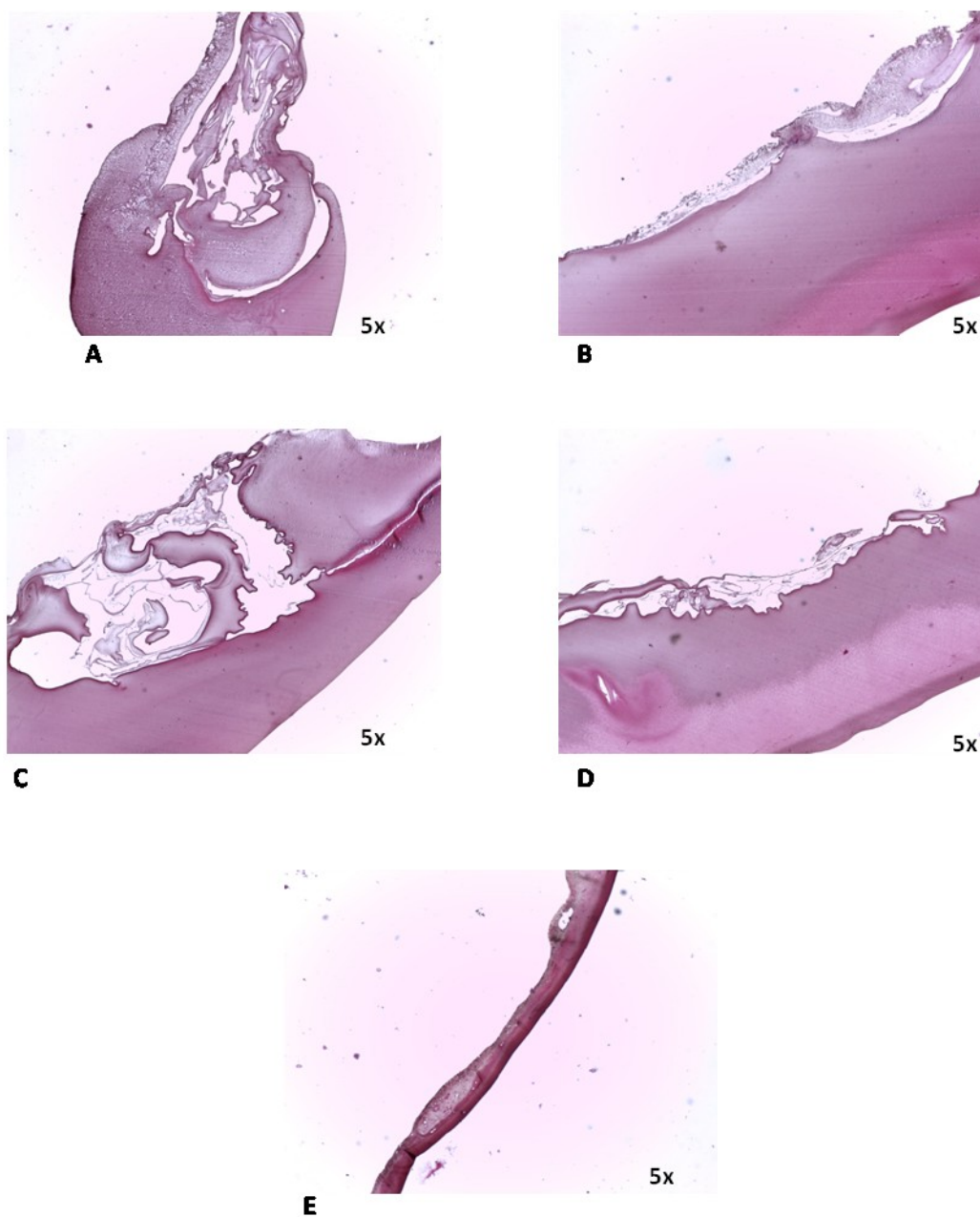


Fig. 6: Ematossilina/Eosina di gel ottenuti dalla combinazione di matrice e fibrina nel rapporto di 1:1 (A), 1:2 (B), 1:3 (C), 1:4 (D) e 4:1 (E).

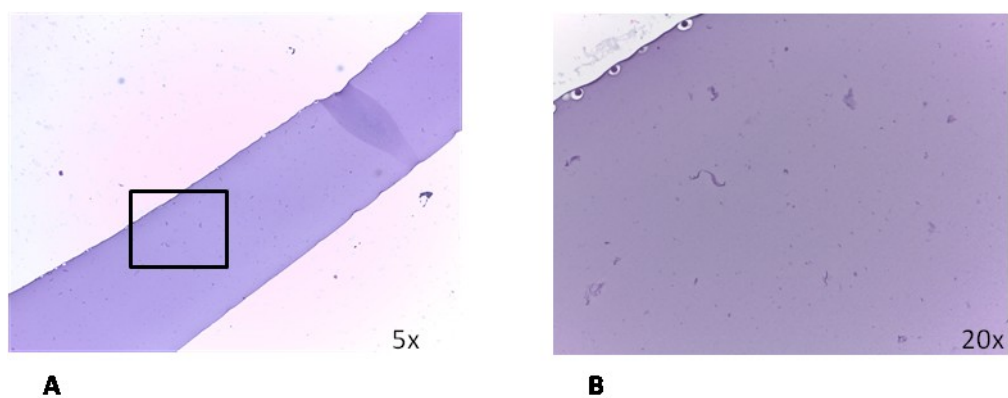


Figura 7: Ematossilina/Eosina di gel ottenuti dalla combinazione di matrice e fibrina nel rapporto di 1:2 e utilizzati come supporto per la coltura delle CPC isolate da cuori umani adulti.

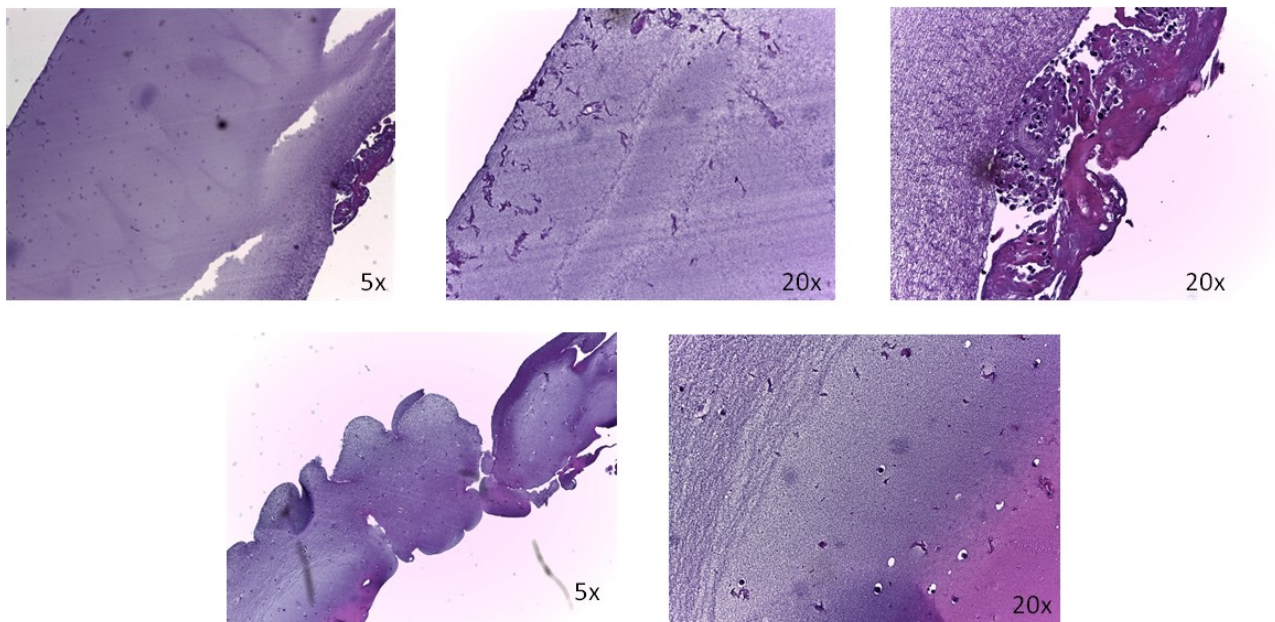


Figura 8: Ematossilina/Eosina di gel ottenuti dalla combinazione di matrice e fibrina nel rapporto di 1:2. E' possibile apprezzare la presenza delle CPC umane inglobate nei gel durante il processo di gelificazione.

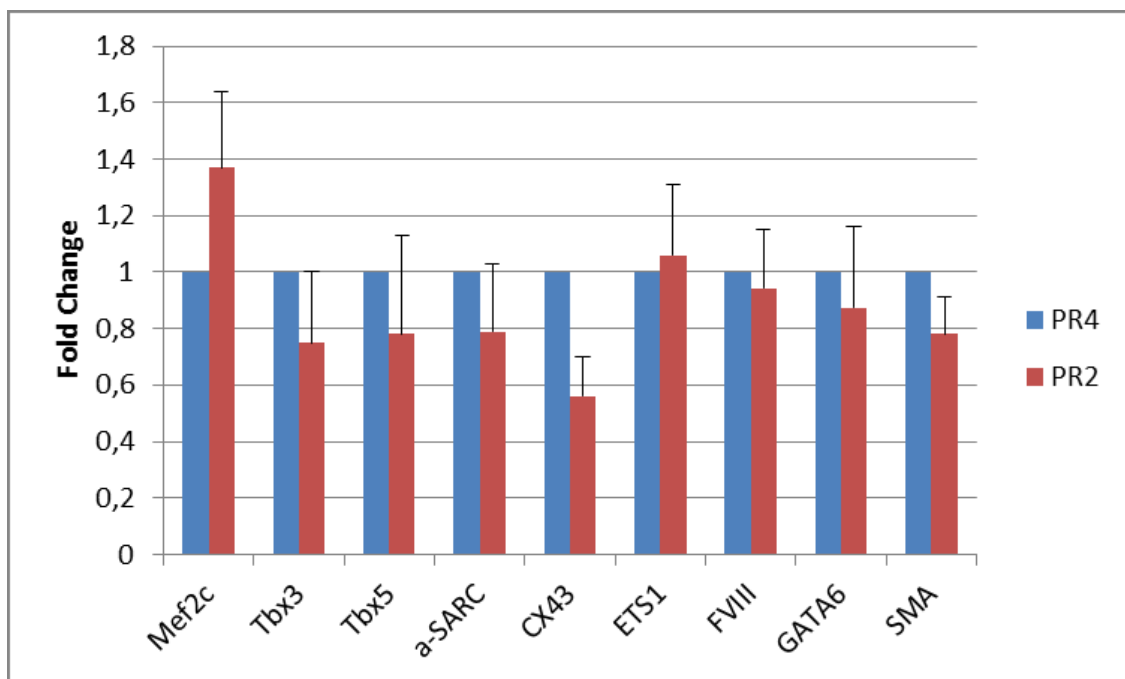


Figura 9: Analisi dei livelli di espressione dei marcatori di differenziamento cardiaco delle CPC umane coltivate sulle matrici decellularizzate con i protocolli 2 e 4.

7. Bibliografia

1. Camici PG; Crea F. *Coronary vascular Dysfunction*. N Engl J Med; 356: 830-840; 2007.
2. Lanza GA; Crea F. *Primary coronary microvascular dysfunction clinical presentation, pathophysiology and management*. Circulation; 121: 2317-2325; 2010.
3. Braunwald E, Pfeffer MA. *Ventricular enlargement and remodeling following acute myocardial infarction: mechanisms and management*. Am J Cardiol; 68(14): 1D-6D; 1991.
4. Augoustides JG, Riha H. *Recent progress in heart failure treatment and heart transplantation*. J Cardiothorac Vasc Anesth, 23(5): 720-724; 2009.
5. Pfeffer MA, Braunwald E. *Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observation and clinical implication*. Circulation; 81(4): 1161-1172; 1990.
6. Simonetti G, Ugenti R, Casciello M, Tamburini C. *Relazione sullo stato sanitario del paese, 2012-2013*. Ministero della salute, 2013.
7. WHO, Fact sheet n°317. *Cardiovascular diseases (CVDs)*, updated January 2015.
8. Lanza GA, Manzoli A, Bia E, Crea F, Maseri A. *Acute effects of nitrates on exercise testing in patients with syndrome X*. Circulation; 90: 2695–2700; 1994.
9. Goodman Gilman A, Rall TW, Nies AS, Taylor P. *Le basi farmacologiche della terapia*. Zanichelli, VIII Ed.
10. Fransioli J, Bailey B, Gude NA, Cottage CT, Muraski JA, Emmanuel G, Wu W, Alvarez R, Rubio M, Ottolenghi S, Schaefer E, Sussman MA. *Evolution of the c-kit-positive cell response to pathological challenge in the myocardium*. Stem Cell; 26(5): 1315-24; 2008.
11. Linke A, Muller P, Nurzynska D, Casarsa C, Torella D, Nascimbene A, Castaldo C, Cascapera S, Böhm M, Quaini F, Urbanek K, Leri A, Hintze TH, Kajstura J, Anversa P. *Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function*. Proc Natl AcadSci USA; 102(25): 8966-8971; 2005.
12. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. *Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium*. Nature; 410(6829): 701-705; 2001.
13. Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, Tsukamoto AS, Gage FH, Weissman IL. *Direct isolation of human central nervous system stem cells*. Proc Natl AcadSci USA; 97(26): 14720-14725; 2000.
14. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan S, Finato N, Bussani R, Nadal-Ginard B, Silvestri F, Leri A, Beltrami AC, Anversa P. *Evidence that human cardiomyocytes divide after myocardial infarction*. N Eng J Med; 344(23): 1750-1757; 2001.
15. Sanada F, Kim J, Czarna A, et al. *C-kit-positive cardiac stem cells nested in hypoxic niches are activated by stem cell factor reversing the aging myopathy*. Circ. Res; 114: 41-55; 2014.

16. Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, Tsukamoto AS, Gage FH, Weissman IL. *Direct isolation of human central nervous system stem cells*. Proc Natl AcadSci USA; 97(26): 14720-14725; 2000.
17. Kubo H, Jaleel N, Kumarapeli A, Berretta RM, Bratinov G, Shan X, et al. *Increased cardiac myocyte progenitors in failing human hearts*. Circulation; 118: 649-57; 2008.
18. Urbanek K, Quaini F, Tasca G, Torella D, Castaldo C, Nadal-Ginard B, Leri A, Kajstura J, Quaini E, Anversa P. *Intense Myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy*. Proc Natl AcadSci USA; 100(18): 10440-10445; 2003.
19. Bayomy A, Bauer M, Qiu L, Liao R. *Regeneration in heart disease- Is ECM the key?*. Life Sciences; 0024-3205; 2012.
20. Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, Jones TR, Reedy MC, Hutcheson KA, Glower DD, Kraus WE. *Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation*. Nat Med; 4(8): 929-933; 1998.
21. Narmoneva DA, Vukmirovic R, Davis ME, Kamm RD, Lee RT. *Endothelial cells promote cardiac myocyte survival and spatial reorganization: implication for cardiac regeneration*. Circulation; 110(8): 962-968; 2004.
22. Deb A, Wang S, Skelding KA, Miller D, Simper D, Caplice NM. *Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: a study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients*. Circulation; 107(9): 1247-1249; 2003.
23. Etzion S, Holbova R, Miller L, Leor J. *Protocols for myocardial infarction repair using fetal cardiac myocytes*. Methods Mol Med; 112:205-21; 2005.
24. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. Science; 282(5391): 1145-1147; 1998.
25. Lee AS, Tang C, Cao F, Xie X, van der Bogt K, Hwang A, Connolly AJ, Robbins RC, Wu JC. *Effect of cell number on teratoma formation by human embryonic stem cell*. Cell Cycle; 8(16): 2608-2612; 2009.
26. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell; 131(5): 861-872; 2007.
27. Zhang J, Wilson GF, Soerens AG, Koonce CH, Yu J, Palecek SP, Thomson JA, Kamp TJ. *Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells*. Circ Res; 104(4): 30-41; 2009.
28. Mouquet F, Pfister O, Jain M, Oikonomopoulos A, Ngoy S, Summer R, et al. *Restoration of cardiac progenitor cells after myocardial infarction by self-proliferation and selective homing of bone marrow-derived stem cells*. Circ Res; 97: 1090-2; 2005.
29. Rota M., Leri AR, Anversa P. *Human heart failure: is cell therapy a valid option?*. Biochem pharmacol; 88(2): 129-138; 2014.

30. Taylor DO, Edwards LB, Aurora P, Christie JD, Dobbels F, Kirk R, et al. *Registry of the international Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-fifth official adult heart transplant report-2008*. J Heart Lung Transplant; 27(9): 943-956; 2008.
31. Gonzales C, Pedrazzini T. *Progenitor cell therapy for heart disease*. Exp Cell Res; 315(18): 3077-3085; 2009.
32. Strauer BE, Steinhoff G. *10 years of intracoronary and intramyocardial bone marrow stem cell therapy of the heart from the methodological origin to clinical practice*. J Am Coll Cardiol; 58: 1095-104; 2011.
33. Mozid AM, Arnous S, Sammut EC, Mathur A. *Stem cell therapy for heart disease*. Br Med Bull; 98: 143-59; 2011.
34. Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. *The extracellular matrix at a glance*. J Cell Science; 123: 4195-4200; 2010.
35. Xian X, Gopal S and Couchman JR. *Syndecans receptors and organizers of the extracellular matrix*. Cell Tissue Res; 339: 31-46; 2010.
36. Bosman FT and Stamenkovic I. *Functional structure and composition of the extracellular matrix*. J Pathol; 200: 423-428; 2003.
37. Harburger DS and Calderwood DA. *Integrin signalling at a glance*. J. Cell Sci; 122: 159-163; 2009.
38. Hynes RO. *Integrins: bidirectional signaling machines*. Cell; 110: 673-687; 2002.
39. Schaefer L; Schaefer, RM. *Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules*. Cell Tissue Res; 339: 237-246; 2010.
40. Esko JD; Kimata K; Lindahl U. *Proteoglycans and sulfate glycosaminoglycans*. In: Varki A; Cumming, RD, Esko, JD, et al, editors. Essentials of Glycobiology. 2. Vol. Chapter 16, 2009.
41. Kress H, Schonherr E. *Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control*. J Cell Physiol; 189: 266-274; 2001.
42. Tumova S, Woods A, Couchman JR. *Heparan sulfate proteoglycans on the cell surface: versatile coordinators of cellular functions*. Int J Biochem Cell Biol; 32: 269-288; 2000.
43. Labat-Robert J, Robert AM and Robert L. *Aging of the extracellular matrix*. Méd Longév; 4: 3-32; 2012.
44. Singh P, Carraher C and Schwarzbauer JE. *Assembly of fibronectin extracellular matrix*. Annu Rev Cell Dev Biol; 26: 397-419; 2010.
45. Tzu J and Marinkovich MP. *Bridging structure with function: structural, regulatory, and developmental role of laminins*. Int J Biochem Cell Biol; 40: 199-214; 2008.
46. Chiquet-Ehrismann R and Tucker RP. *Connective tissues: signalling by tenascins*. Int J Biochem Cell Biol; 36: 1085-1089; 2004.

47. Mahipal Singh, Suman Dalal, and Krishna Singh. *Osteopontin: At the Cross-roads of Myocyte Survival and Myocardial Function*. Life Sci; 118(1): 1–6; 2014.
48. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K and Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. London: Garland Science; 2007.
49. Tanzer ML. *Current concepts of extracellular matrix*. J Orthop Sci; 11: 326-331; 2006.
50. Rozario T and De Simone DW. *The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view*. Dev Biol; 341: 126-140; 2010.
51. Heino J. *The collagen family members as cell adhesion proteins*. Bioessays; 29: 1001-1010; 2007.
52. Lodish H, Berek A, Zipursky SL, Matsudaria P, Baltimore D, Darnell JE. *Biologia molecolare della cellula*. Zanichelli 2° ed.; 2002.
53. Colombo R, Olmo E. *Cellule e tessuti, Biologia*. Ed.II, Edi-ermes, pg.451, cap.XIV; 2014.
54. Wierzbicka-Patynowski I and Schwarzbauer JE. *The ins and outs of fibronectin matrix assembly*. J Cell Sci; 116: 3269-3276; 2003.
55. Jugdutt BI. *Remodeling of the myocardium and potential targets in the collagen degradation and synthesis pathways*. Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord; 3: 1-30; 2003.
56. Eckes B, Nischt R and Krieg T. *Cell-matrix interactions in dermal repair and scarring*. Fibrogenesis Tissue Repair; 3:4; 2010.
57. Castaldo C, Di Meglio F, Nurzynska D, Romano GP, Maiello C, Bancone C, Müller P, Böhm M, Cotrufo M, Montagnani S. *CD117- Positive cells in adult human heart are localized in the subepicardium, and their activation is associated with Laminin-1 and $\alpha 6$ integrin expression*. Stem Cells; 26: 1723-1731; 2008.
58. Bandopadhyay M, Bulbule A, Butti R, Chakraborty G, Ghorpade P, Ghosh P, Gorain M, Kale S, Kumar D, Kumar S, Totakura KV, Roy G, Sharma P, Shetti D, Soundararajan G, Thorat D, Tomar D, Nalukurthi R, Raja R, Mishra R, Yadav AS, Kundu GC. *Osteopontin as a therapeutic target for cancer*. Expert Opin Ther Targets; 18(8):883-95; 2014.
59. Christian Frantz, Kathleen M. Stewart, V. M. Weaver. *The extracellular matrix at a glance*. J. Cell Sci; 123:4195-4200; 2010.
60. Visse R, Nagase H. *Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry*. Circ Res; 92(8):827-39; 2003.
61. Wilton E and Jahangiri M. *Post-stenotic aortic dilatation*. J Cardiothorac Surg1: 7; 2006.
62. Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. *Matrix Metalloproteinases and Cardiovascular Disease*. Circulation Research, 1995.
63. Nag AC. *Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: a fine structural analysis and distribution*. Cytobios; 28: 41-61; 1980.

64. Zak R. *Development and proliferative capacity of cardiac muscle cells*. Circ Res; 35 (suppl II) : 17-26; 1974.
65. Goldsmith EC, Borg TK. *The dynamic interaction of the extracellular matrix in cardiac remodeling*. J Card Fail; 8: 314-318; 2002.
66. Iruela- Arispe ML & Sage EH. *Expression of type VIII collagen during morphogenesis of the chicken and mouse heart*. Developmental Biology; 144: 107-118; 1991.
67. De Arcangelis A, Neuville P, Boukamel R, Lefebvre O, Kedinger M, Simon-Assmann P. *Inhibition of laminin alpha 1-chain expression leads to alterations of basement membrane assembly and cell differentiation*. J Cell Biology; 133: 417-430; 1996.
68. Colognato H and Yurchenco PD. *Form and function: the laminin family of heterodimers*. Developmental Dynamics Biology; 218: 213-234; 2000.
69. Miner JH, Yurchenco PD. *Laminin functions in tissue morphogenesis*. Annu Rev Cell and Developmental Biology; 20: 255-284; 2004.
70. Araya G, Diaz, Vivar R, Humeres C, Boza P, Bolivar S, Munoz C. *Cardiac fibroblasts as sentinel cells in cardiac tissue: Receptor, signaling pathways and cellular functions*. Pharmacological Research; 1043-6618; 2015.
71. Hinz B, Phan SH, Thannickai VJ, Prunotto M, Desmouliere A, Varga J, et al. *Recent developments in myofibroblast biology*. Am J Pathol; 180: 1340-55; 2012.
72. Hinz B, Phan SH, Thannickai VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. *The myofibroblast. One function, multiple origins*. The American Journal of Pathology; 170(6) 1807-1816; 2007.
73. Dobaczewski M, Gonzales-Quesada C, Frangogiannis NG. *The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction*. J Mol and Cell Cardiology; 48: 504-511; 2009.
74. Kim HE, Dalal SS, Young E, Legato MJ, Weisfeldt ML, D'Armiento J. *Disruption of the myocardial extracellular matrix leads to cardiac dysfunction*. J Clinical Investigation; 106 (7): 857-66; 2000.
75. Tao ZY, Cava sin MA, Yang F, Liu YH, Yang XP. *Temporal changes in matrix metalloproteinase expression and inflammatory response associated with cardiac rupture after myocardial infarction in mice*. Life Science; 74 (12): 1561-72; 2004.
76. Holmes JW. *The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases*. J Pathol; 200: 500-3; 2003.
77. Serini G, Bochaton-Piallat ML, Ropraz P, Geinoz A, Borsi L, Zardi L, et al. *The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta 1*. J Cell Biol; 142: 873-81; 1998.
78. Lerman RH, Apstein CS, Kagan HM, Osmer EL, Chichester Co, Vogel WM, et al. *Myocardial healing and repair after experimental infarction in the rabbit*. Circ Res; 53: 378-88; 1983.

79. Holmes JW, Borg TK, Covell JW. *Structure and mechanics of healing myocardial infarcts*. Annu Rev Biomed Eng; 7: 223-53; 2005.
80. Mydel P, Shipley JM, Adair-Kirk TL, Kelley DG, Broekelmann TJ, Mecham RP, Senior RM. *Neutrophil elastase cleaves laminin-332 (laminin-5) generating peptides that are chemotactic for neutrophils*. J Biol Chemistry; 283(15): 9513-9522; 2008.
81. Schedin P, Strange R, Mitrenga T, Wolfe P, Kaeck M. *Fibronectin fragments induce MMP activity in mouse mammary epithelial cells: evidence for a role in mammary tissue remodeling*. J Cell Science; 113(5): 795-806; 2000.
82. Willems IE, Arends JW, Daemen MJ. *Tenascin and fibronectin expression in healing human myocardial scars*. J Pathol; 179: 321-5; 1996.
83. Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Nishikawa T, Ishiyama S, Shimojo T, Ohta Y, et al. *Tenascin-C modulates adhesion of cardiomyocytes to extracellular matrix during tissue remodeling after myocardial infarction*. Lab Invest; 81: 1015-24; 2001.
84. Langer R, Vacanti JP. *Tissue engineering*. Science. 1993; 260: 920.
85. Ghasemi-Mobarakeh L, Molamma Prabhakaran P, Lingling Tian, Elham Shamirzaei-Jeshvaghani, Dehghani L, Ramakrishna S. *Structural properties of scaffolds: Crucial parameters towards stem cell differentiation*. World J Stem Cell; 7 (4): 728-744; 2015.
86. Low WC, Rujitanaroj PO, Lee DK, Messersmith PB, Stanton LW, Goh E, Chew SY. *Nanofibrous scaffold-mediated REST knockdown to enhance neuronal differentiation of stem cells*. Biomaterials; 34: 3581–3590; 2013.
87. Karande TS, Agrawal CM. *Functions and requirements of synthetic scaffolds in tissue engineering*. In: Laurencin CT, Nair LS editors. Nanotechnology and tissue engineering: the scaffold. CRC Press, Taylor & Francis Group; 2008.
88. Jerome C, Lecomte P. *Recent advances in the synthesis of aliphatic polyesters by ring-opening polymerization*. Adv Drug Delivery Rev; 60: 1056–1076; 2008.
89. Takeuchi M, Kuratani T, Miyagawa S, Shirakawa Y, Shimamura K, Kin K, Yoshida T, Arai Y, Hoashi T, Teramoto N, Hirakawa K, Kawaguchi N, Sawa Y. *Tissue-engineered stent-graft integrates with aortic wall by recruiting host tissue into graft scaffold*. J Thorac Cardiovasc Surg; 148 (4): 1719-25; 2014.
90. Liu A, Xue GH, Sun M, Shao HF, Ma CY, Gao Q, Gou ZR, Yan SG, Liu YM, He Y. *3D Printing Surgical Implants at the clinic: A Experimental Study on Anterior Cruciate Ligament Reconstruction*. Sci Rep; 6: 21704; 2016.
91. Nouailhas H, Li F, El Ghzaoui A, Li SM, Coudane J. *Influence of racemization on stereocomplex-induced gelation of water-soluble polylactide-poly(ethylene glycol) block copolymers*. Polym Int ; 59:1077–1083; 2010.
92. Brandl FP, Seitz AK, Tessmar JK, Blunk T, Göpferich AM. *Enzymatically degradable poly(ethylene glycol) based hydrogels for adipose tissue engineering*. Biomaterials; 31(14): 3957-66; 2010.

93. Sartori S, Boffito M, Serafini P, Caporale A, Silvestri A, Bernardi E, Sassi MP, Boccafroschi F, Ciardelli G. *Synthesis and structure – property relationship of polyester-urethanes and their evaluation for the regeneration of contractile tissues*. React Funct Polym; 73: 1366 -1376; 2013.
94. Parenteau-Bareil R, Gauvin R, Berthod F. *Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications*. Materials; 3: 1863-1887; 2010.
95. Gorgieva S, Kokol V. *Collagen-vs. Gelatine-based biomaterials and their biocompatibility: Review and perspectives*. Biomaterials Applications for Nanomedicine; 17-58; 2011.
96. Chattopadhyay S, Raines RT. *Review collagen-based biomaterials for wound healing*; 101(8): 821-33; 2014.
97. Lynn AK, Yannas IV. Bonfield W. *Antigenicity and immunogenicity of collagen*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater; 71: 343-354; 2004.
98. Tamer AE Ahmed, Dare EV, Hincke M. *Fibrin: A Versatile Scaffold for Tissue Engineering Applications*. Tissue Engineering; 14(2): 199-215; 2008.
99. Pilar de la Puente, Ludeña D. *Cell culture in autologous fibrin scaffolds for applications in tissue engineering*. Exp Cell Res; 322 (1): 1-11; 2014.
100. Johnson TD, Christman KL. *Injectable hydrogel therapies and their delivery strategies for treating myocardial infarction*. Expert Opin Drug Deliv; 10 (1): 59-72; 2013.
101. Williams C, Budina E, Stoppel WL, Sullivan KE, Emani S, Emani SM, Black LD. *Cardiac extracellular matrix-fibrin hybrid scaffolds with tunable properties for cardiovascular tissue engineering*. Acta Biomater; 14: 84-95; 2015.
102. Weber M, Heta E, Moreira R, Gesche VN, Schermer T, Frese J, Jockenhoevel S, and Mela P. *Tissue-Engineered Fibrin-Based Heart Valve with a Tubular Leaflet Design*. Tissue Eng Part C Methods; 20 (4): 265–275; 2014.
103. Norazril SA, Aminuddin BS, Norhayati MM, Mazlyzam AL, Fauziah O, Ruszymah BH. *Comparison of chitosan scaffold and chitosan-collagen scaffold: a preliminary study*. The Medical Journal of Malaysia; 59 Suppl B: 186-187; 2004.
104. Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. *Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function*. Acta Biomater; 5 (1): 1-13; 2009.
105. Vorotnikova F, McIntosh D, Dewilde A, Zhang J, Reing JE, Zhang L, et al. *Extracellular matrix-derived products modulate endothelial and progenitor cell migration and proliferation in vitro and stimulate regenerative healing in vivo*. Matrix Biol; 29 (8): 690-700; 2010.
106. Bader A, Schilling T, Teebken OE, Brandes G, Herden T, Steinhoff G. *Tissue engineering of heart valves – human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves*. Eur J CardiothoracSurg; 14: 279–284; 1998.
107. Schenke-Layland K, Vasilevski O, Opitz F, König K, Riemann I, Halbhuber KJ, et al. *Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves*. J Struct Biol; 143 (3): 201–208; 2003.

108. Conklin BS, Richter ER, Kreutziger KL, Zhong DS, Chen S. *Development and evaluation of a novel decellularized vascular xenograft*. Med Eng Phys; 24: 173–183; 2002.
109. Uchimura E, Sawa Y, Taketani S, Yamanaka Y, Hara M, Matsuda H. *Novel method of preparing acellular cardiovascular grafts by decellularization with poly(ethylene glycol)*. J Biomed Mater Res A; 67: 834–837; 2003.
110. Chen RN, Ho HO, Tsai YT, Sheu MT. *Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications*. Biomaterials; 25: 2679–2686; 2004.
111. Hudson TW, Liu SY, Schmidt CE. *Engineering an improved acellular nerve graft via optimized chemical processing*. Tissue Eng; 10: 1346–1358; 2004.
112. Kim BS, Yoo JJ, Atala A. *Peripheral nerve regeneration using acellular nerve grafts*. J Biomed Mater Res; 68 A (2), 201–209; 2004.
113. Borschel GH, Dennis RG, Kuzon JWM. *Contractile skeletal muscle tissue-engineered on an acellular scaffold*. Plast Reconstr Surg; 113: 595–602; 2004.
114. Cartmell JS, Dunn MG. *Effect of chemical treatment on tendon cellularity and mechanical properties*. J Biomed Mater Res; 49: 134–140; 2000.
115. Woods T, Gratzer PF. *Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone–anterior cruciate ligament–bone graft*. Biomaterials; 26 (35): 7339–7349; 2005.
116. Badylak SF, Lantz GC, Coffey A, Geddes LA. *Small intestinal submucosa as a large diameter vascular graft in the dog*. J Surg Res; 47 (1): 74–80; 1989.
117. Kropp BP, Eppley BL, Prevel CD, Rippey MK, Harruff RC, Badylak SF et al. *Experimental assessment of small intestinal submucosa as a bladder wall substitute*. Urology; 46 (3): 396–400; 1995.
118. Chen F, Yoo JJ, Atala A. *Acellular collagen matrix as a possible “off the shelf” biomaterial for urethral repair*. Urology; 54 (3): 407–410; 1999.
119. Gilbert TW, Stolz DB, Biancaniello F, Simmons-Byrd A, Badylak SF. *Production and characterization of ECM powder: implications for tissue engineering applications*. Biomaterials; 26 (12): 1431–1435; 2005.
120. Lin P, Chan WC, Badylak SF, Bhatia SN. *Assessing porcine liver-derived biomatrix for hepatic tissue engineering*. Tissue Eng; 10 (7–8): 1046–1053; 2004.
121. Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, Netoff TI, et al. *Perfusion decellularized matrix: using nature’s platform to engineer a bioartificial heart*. Nat Med; 14 (2): 213–221; 2008.
122. Petersen TH, Calle EA, Zhao L, Lee EJ, Gui L, Raredon MB, et al. *Tissue-engineered lungs for in vivo implantation*. Science; 329 (5991): 538–541; 2010.
123. Wainwright JM, Czajka CA, Patel UB, Freytes DO, Tobita K, Gilbert TW, et al. *Preparation of cardiac extracellular matrix from an intact porcine heart*. Tissue Eng; Part C Methods, 16 (3): 525–532; 2010.

- 124.Cortiella J, Niles J, Cantu A, Brettler A, Pham A, Vargas G, et al. *Influence of acellular natural lung matrix on murine embryonic stem cell differentiation and tissue formation*. Tissue Eng; Part A, 16 (8): 2565-2580; 2010.
- 125.Crapo PM, Ph.D., Gilbert TW, Ph.D., and Badylak SF, D.V.M., Ph.D., M.D. *An overview of tissue and whole organ decellularization*, Biomaterials; 32 (12): 3233-3243; 2011.
- 126.Oberwallner B, Brodarac A, Choi YH, Saric T, Anić P, Morawietz L, Stamm C. *Preparation of cardiac extracellular matrix scaffolds by decellularization of human myocardium*. J Biomed Mater Res A; 102(9): 3263-72; 2014.
127. Liqiong Gui, Chan SA, Breuer CK, Niklason LE. *Novel Utilization of Serum in Tissue Decellularization*. Tissue Eng Part C Methods; 16 (2): 173–184; 2010.
- 128.Godier-Furnémont AF, Martens TP, Koeckert MS, Wan L, Parks J, Arai K, Zhang G, Hudson B, Homma S, Vunjak-Novakovic G. *Composite scaffold provides a cell delivery platform for cardiovascular repair*. ProcNatlAcad Sci; 10;108(19):7974-9; 2011.
- 129.Mirsadraee S, Wilcox HE, Korossis SA, Kearney JN, Watterson KG, Fisher J, Ingham E. *Development and characterization of an acellular human pericardial matrix for tissue engineering*. Tissue Eng; 12(4): 763-73; 2006.
- 130.Ott HC, Matthiesen TS, Saik-Kia Goh, Black LD, Kren SM, Netoff TI, Taylor DA. *Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart*. Nature Medicine; 14: 213 – 221; 2008.
- 131.Freshney RI. *Culture of animal cells*. 4a ed.: 149-177, New York: Wiley-Liss; 2000.
- 132.Ptaszek L.M., et al. *Towards regenerative therapy for cardiac disease*. Lancet; 379 (9819): p. 933-42; 2012.
- 133.Hipp J, Atala A. *Sources of stem cells for regenerative medicine*. Stem Cell Rev, 4:3-11; 2008.
- 134.Li T.S., et al. *Direct comparison of different stem cell types and subpopulations reveals superior paracrine potency and myocardial repair efficacy with cardiosphere-derived cells*. J Am Coll Cardiol; 59(10): p. 942-53; 2012.
- 135.Chavakis E, Koyanagi M, Dimmeler S. *Enhancing the outcome of cell therapy for cardiac repair: progress from bench to bedside and back*. Circulation;121(2): 325-35; 2010.
- 136.Moore KA, Lemischka IR. *Stem cells and their niches*. ;311(5769): 1880-5; 2006.
- 137.Chitteti BR, Cheng YH, Poteat B, Rodriguez-Rodriguez S, Goebel WS, Carlesso N, Kacena MA, Srouf EF. *Impact of interactions of cellular components of the bone marrow microenvironment on hematopoietic stem and progenitor cell function*. Blood; 22,115(16):3239-48; 2010.
- 138.Faulk DM, Johnson SA, Zhang L, Badylak SF. *Role of the extracellular matrix in whole organ engineering*. J Cell Physiol; 229(8): 984-9; 2014.
- 139.Hynes RO. *The extracellular matrix: not just pretty fibrils*. Science; 326(5957): 1216-9; 2009.

140. Lutolf MP, Hubbell JA. *Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering*. Nat Biotechnol; 23(1): 47-55; 2005.
141. Sartori S, Boffito M, Serafini P, Caporale A, Silvestri A, Bernardi E, Sassi MP, Boccafroschi F, Ciardelli G. *Synthesis and structure-property relationship of polyester-urethanes and their evaluation for the regeneration of contractile tissues*. React Funct Polym; 73: 1366-1376; 2013.
142. Mironov et al. *Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering*. Trends in Biotechnology, 21: 157; 2003.
143. Qi-Zhi Chen, Siân E. Harding, Nadire N. Ali, Alexander R. Lyon, Aldo R. Boccaccini. *Biomaterials in cardiac tissue engineering: Ten years of research survey*. Materials Science and Engineering; R 59 1-37; 2008.
144. Kajitani M, Wadia Y, Hinds MT, Teach J, Swartz KR, and Gregory KW. *Successful repair of esophageal injury using an elastin based biomaterial patch*. ASAIO Journal, vol. 47, no. 4, pp. 342–345; 2001.
145. Sellaro TL, Ravindra AK, Stolz DB, and Badylak SF. *Maintenance of hepatic sinusoidal endothelial cell phenotype in vitro using organ-specific extracellular matrix scaffolds*. Tissue Engineering, vol. 13, no. 9, pp. 2301–2310; 2007.
146. J.M. Singelyn, J. A. DeQuach, S. B. Seif-Naraghi, R.B. Littlefield, P. J. Schup-Magoffin, and K. L. Christman, “Naturally derived myocardial matrix as an injectable scaffold for cardiac tissue engineering,” *Biomaterials*, vol. 30, no. 29, pp. 5409–5416; 2009.
147. Singelyn JM and Christman KL. *Injectable materials for the treatment of myocardial infarction and heart failure: the promise of decellularized matrices*. Journal of Cardiovascular Translational Research, vol. 3, no. 5, pp. 478–486; 2010.
148. Bobylev DO, Chebotar S, Tudorake I, Khaverikh A. *Tissue engineering of heart valves: new opportunities and challenges*. Kardiologiia; 51(12): 50-6; 2011.
149. Badylak SF, Taylor D, Uygun K. *Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds*. Annu Rev Biomed Eng; 13: 27-53; 2011.